

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012988818

WPI Acc No: 2000-160671/200014

XRAM Acc No: C00-050158

Use of insect alpha-galactosyltransferase for producing
alpha-galactosylated compounds, useful e.g. as antibacterial or antiviral
agents, probiotics and growth promoters

Patent Assignee: CNRS CENT NAT RECH SCI (CNRS)

Inventor: DELANNOY P R; DEVAUCHELLE G; LOPEZ M; QUIOT J; QUIOT J M

Number of Countries: 086 Number of Patents: 004

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Week |
|--------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| WO 200000595 | A1 | 20000106 | WO 99FR1562 | A | 19990629 | 200014 B |
| FR 2780413 | A1 | 19991231 | FR 988228 | A | 19980629 | 200014 |
| AU 9943763 | A | 20000117 | AU 9943763 | A | 19990629 | 200026 |
| EP 1092012 | A1 | 20010418 | EP 99926565 | A | 19990629 | 200123 |
| | | | WO 99FR1562 | A | 19990629 | |

Priority Applications (No Type Date): FR 988228 A 19980629

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 200000595 A1 F 52 C12N-009/10

Designated States (National): AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN
CU CZ DE DK EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ
LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK
SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR
IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ UG ZW

FR 2780413 A1 C12N-009/40

AU 9943763 A C12N-009/10 Based on patent WO 200000595

EP 1092012 A1 F C12N-009/10 Based on patent WO 200000595

Designated States (Regional): DE FR GB IT

BEST AVAILABLE COPY

Abstract (Basic): WO 200000595 A1

NOVELTY - Use of enzymes (I) with alpha-galactosyltransferase (aGT) activity derived from insect cells, for the enzymatic production of alpha-galactosylated compounds (II) by the transfer of galactose (Gal) on to a terminal Gal residue of a selected substrate, is new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (a) the cell line CNCM I-2045, from *Mamestra brassicae*;
- (b) cell extract with aGT, particularly alpha-1,4-aGT, activity, produced from insect cells;
- (c) enzymatic production of (II) by reacting UDP (uridine-diphosphate)-Gal with a substrate in presence of (I), optionally followed by purification;
- (d) compounds of formula (IIa);
- (e) pharmaceutical composition containing (IIa) and a vehicle, optionally also one or more antibiotics; and
- (f) food composition containing (IIa).

Galalpha1-nGalbeta1-no-X-R (IIa)

n0=1-4 or 6 and is the position on residue X of the carbon atom carrying a hydroxy group that binds to Galbeta1, particularly 3 or 4;

n=position of carbon atom on second Gal that carries the hydroxy group which binds to transferred Galalpha1;

X=oside, particularly the residue of Gal, glucose (Glc),

N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) or 2-O-acetyl-D-galactopyranose;

R=hydrogen, mono- or oligo-saccharide, oside or oligoside carrying an aglycone at its reducing end, an aglycone (e.g. benzyl, phenyl (optionally substituted, particularly 4-nitrophenyl) or 1-10C alkyl, particularly 1-7C linear alkyl), glycoprotein (preferably substituted by O-glycans such as asialo-fetuin), amino acid, peptide, protein or neoglycoprotein (preferably bovine serum albumin coupled to an oligoside), glycolipid (particularly lactosylceramide or gangliosides GD3 or GM3), a lipid, a ceramide, or a multivalent non-immunogenic carrier (preferably derived from polyacrylamide or polylysine in which sidechains are substituted by Galbeta1-n0-X).

ACTIVITY - Antibacterial; antiviral; anabolic; probiotic.

MECHANISM OF ACTION - None given.

USE - (II) are probiotics and growth factors, useful in human and animal foods and pharmaceuticals, particularly for preventing or treating bacterial and viral infections (e.g. *Escherichia coli* or *Streptococcus suis*). Glycans containing the Galalpha1-4Gal motif can also be used in vaccines, e.g. to control parvovirus B19.

ADVANTAGE - (I) have high activity for the production of (II) (for which chemical methods produce only low yields).

pp; 52 DwgNo 0/0

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - BIOLOGY - Preferred Enzymes: The enzyme with aGT activity is alpha1,4-GT and is obtained from lepidopteran cells, specifically Spodoptera (S. frugiperda), Trichoplusia (T. ni) or Mamestra (M. brassicae), most particularly I-2045.

Preferred Process: The reaction is catalyzed by insect cells themselves, or by a cellular extract. It results in a compound having the motif Galalpha1-4Gal at the non-reducing end. The substrate is Galbeta1-n0-X-R.

Preparation: Cell lines producing (I) are produced by culturing explants from insects for about 8 months, with weekly passaging, to establish permanent cell lines which are then cloned. Extraction of the cells is by lysis, centrifugation at low speed, ultracentrifugation and elimination of the supernatant. The pellet (microsomal fraction) is then resuspended in 0.25 M sucrose-0.2 M sodium chloride and preserved at -80 degrees C.

POLYMERS - A suitable non-immunogenic carrier for (II) is polyacrylamide.

Title Terms: INSECT; ALPHA; PRODUCE; ALPHA; COMPOUND; USEFUL; ANTIBACTERIAL ; ANTIVIRAL; AGENT; GROWTH; PROMOTE

Derwent Class: A96; B03; B04; D13; D16

International Patent Class (Main): C12N-009/10; C12N-009/40

International Patent Class (Additional): A23L-003/3562; A61K-031/715;

C12N-005/06; C12P-019/18

File Segment: CPI

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 780 413

(21) N° d'enregistrement national : **98 08228**

(51) Int Cl⁶ : C 12 N 9/40, C 12 N 5/06, C 12 P 19/18, A 61 K 31/
715, A 23 L 3/3562

(12)

BREVET D'INVENTION

B1

(54) ENZYMES A ACTIVITE ALPHA-GALACTOSYLTRANSFERASE DE CELLULES D'INSECTES,
ET LEURS UTILISATIONS.

(22) Date de dépôt : 29.06.98.

(30) Priorité :

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement
public à caractère scientifique et technologique — FR.*

(43) Date de mise à la disposition du public
de la demande : 31.12.99 Bulletin 99/52.

(45) Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 21.03.03 Bulletin 03/12.

(72) Inventeur(s) : LOPEZ MICHEL, DELANNOY
PHILIPPE ROBERT, QUIOT JEAN MARIE et
DEVAUCHELLE GERARD.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET
DEMACHY SARL.

FR 2 780 413 - B1



ENZYMES A ACTIVITE α -GALACTOSYLTRANSFERASE DE CELLULES D'INSECTES, ET LEURS UTILISATIONS

5 La présente invention a pour objet l'utilisation d'enzymes à activité α -galactosyltransférase provenant de cellules d'insectes pour la mise en oeuvre de procédés enzymatiques de transfert de résidus galactose sur un résidu terminal de galactose d'un substrat déterminé, notamment dans le cadre de la préparation de composés α -galactosylés utilisables en tant que probiotiques ou facteurs de croissance dans des compositions alimentaires ou pharmaceutiques destinées à l'homme ou à l'animal.

10 L'invention concerne également les procédés enzymatiques susmentionnés de transfert de résidus galactose, ainsi que les composés obtenus par ces procédés, et les compositions alimentaires ou pharmaceutiques comprenant lesdits composés.

15 De nombreuses études ont tenté d'identifier la structure des *N*-glycannes portés par des glycoprotéines exprimées dans différentes cellules d'insectes, principalement dans la lignée *Spodoptera frugiperda* 9, en utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression. Deux familles de *N*-glycannes ont été essentiellement retrouvées, (i) des structures de type oligomannosidique (Man₉₋₅GlcNAc₂), et (ii) de petites structures tronquées, fréquemment porteuses d'un résidu de fucose lié en α 1,6 sur le résidu de GlcNAc impliqué dans la liaison *N*-glycosidique (Man₃₋₂[Fuc₀₋₁]GlcNAc₂) (Kuroda *et al.*, 1986a; Jarvis et Summers, 1989; Kuroda *et al.*, 1989; Kuroda *et al.*, 1990; Kuroda *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1991; Wathen *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1991; Noteborn *et al.*, 1992; Veit *et al.*, 1993; Voss *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1993; Manneberg *et al.*, 1994; Ponimaskin *et al.*, 1994, Lopez *et al.*, 1997). De plus, une petite proportion de structures hybrides contenant un unique résidu de GlcNAc en position terminale a été mis en évidence sur l'interleukine-3 murine exprimée dans des larves de *Bombix mori* (Hogeland et Deinzer, 1994) et récemment, une analyse des *N*-glycopeptides issus de l'interféron γ humain produit dans la lignée cellulaire d'insecte *Estigmene acrea* a permis de mettre en évidence des *N*-glycannes de type hybride et de type *N*-acétyllactosaminique possédant des résidus de GlcNAc et de Gal en position terminale non réductrice (Ogonah *et al.*, 1996). En revanche, un seul groupe a montré que le plasminogène humain recombinant produit dans les lignées de lépidoptères *Spodoptera frugiperda* 21 et *Mamestra brassicae* en utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression, pouvait être porteur de glycannes de type *N*-acétyllactosaminique bi, tri- et tétra-

antennés avec des résidus d'acide sialique en position terminale (Davidson *et al.*, 1990; Davidson and Castellino, 1991a et 1991b).

L'étude des *N*-glycannes qui substituent les glycoprotéines endogènes d'insectes prouve que ces dernières sont totalement dépourvues de glycannes de type *N*-acétyllactosaminique (Butters and Hughes, 1981; Hsieh and Robbins, 1984; Williams *et al.*, 1991) mais peuvent porter des oligosaccharides possédant des résidus de GlcNAc ou de GalNAc en position terminale non réductrice (Hard *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1994). D'autres équipes ont recherché dans les lignées cellulaires de lépidoptères les activités enzymatiques, qui catalysent dans les cellules de mammifères, la transformation des *N*-glycannes de type oligomannosidique en structures hybrides puis en structures *N*-acétyllactosaminiques. Ces travaux ont montré que les cellules de lépidoptères possèdent une activité α -mannosidase II (Altmann and März, 1995), une très faible activité β 1,2-*N*-acétylglucosaminyltransférase I (Altmann *et al.*, 1993a; Velardo *et al.*, 1993), des activités α 1,6- ou α 1,3-fucosyltransférases (Staudacher *et al.*, 1992b), et sont totalement dépourvues des activités β 1,4-galactosyltransférase et sialyltransférases.

Les investigations se sont principalement focalisées sur l'identification des *N*-glycannes synthétisés par les insectes, au détriment de l'évaluation des capacités de *O*-glycosylation de ces lignées. A ce jour, les *O*-glycannes d'insectes identifiés sont essentiellement des structures simples, réduites au noyau (GalNAc ou Gal β 1-3GalNAc), sans squelette ni sucre périphérique. La comparaison des *O*-glycannes portés par une glycoprotéine recombinante, la gp50 (protéine de l'enveloppe du *pseudorabies virus*), produite simultanément dans la lignée d'insecte *Spodoptera frugiperda* 9, et dans deux lignées de mammifères Vero et CHO montre que les sites de *O*-glycosylation des gp50 exprimées dans les cellules de mammifères sont exclusivement substitués par le disaccharide Gal β 1-3GalNAc porteur de un ou deux résidus d'acide sialique. En revanche, les sites de *O*-glycosylation de la gp50 exprimée dans le système baculovirus-*Spodoptera frugiperda* 9 sont essentiellement occupés par un unique résidu de GalNAc (antigène-Tn) et pour une très faible proportion par le disaccharide Gal β 1-3GalNAc (antigène-T). De plus, les *O*-glycannes de la gp50 exprimée chez l'insecte ne sont jamais porteurs de résidus d'acide sialique (Thomsen *et al.*, 1990). L'analyse des *O*-glycannes portés par la *chimeric respiratory syncytial virus protein* exprimée dans *Spodoptera frugiperda* 9 (Wathen *et al.*, 1991), ou ceux retrouvés sur l'interleukine 2 humaine produite par *Spodoptera frugiperda* 21 (Grabenhorst *et al.*, 1993) confirment la seule présence des antigènes-Tn et -T.

Afin de poursuivre la comparaison entre le potentiel de *O*-glycosylation des lignées cellulaires de mammifères Vero et CHO, et celui de la lignée de lépidoptère *Spodoptera frugiperda* 9, Thomsen *et al.* (1990) ont mesuré dans les trois lignées cellulaires les activités enzymatiques successives responsables de la
5 synthèse des antigènes-Tn et -T : la polypeptide *N*-acétylgalactosaminyl transférase et la β 1,3-galactosyltransférase. Ainsi, les auteurs ont constaté que l'activité polypeptide *N*-acétylgalactosaminyltransférase était similaire dans les trois lignées, mais comme l'analyse structurale le laissait supposer, l'activité β 1,3-galactosyltransférase était extrêmement faible dans les cellules de
10 lépidoptère.

En résumé, la nature des *N*- et *O*-glycannes portés par les glycoprotéines recombinantes exprimées dans le système baculovirus / cellules d'insectes ou par les glycoprotéines endogènes des lignées cellulaires de lépidoptères, ainsi
15 que la mesure des activités glycosyltransférases qui catalysent la synthèse de ces *N*- et *O*-glycannes prouvent que le potentiel de glycosylation des lignées cellulaires d'insectes est déficient par rapport à celui des cellules de mammifères.

On peut conclure des études menées jusqu'à présent sur les cellules d'insectes, qu'il y a peu de galactose dans les cellules d'insectes, et, en tout état
20 de cause, qu'aucune structure galactosidique en α n'a été mise en évidence dans ces dernières.

Aujourd'hui, il est clairement établi que des épitopes oligosaccharidiques substituant des glycoprotéines ou des glycolipides présents à la surface des tissus de nombreux mammifères sont à l'origine de l'impossibilité de réaliser des
25 xénogreffes, en particulier la transplantation d'organes animaux chez l'homme. Le principal responsable du rejet par le corps humain des greffons animaux a été identifié comme étant un épitope α -galactosylé, le disaccharide Gal α 1-3Gal (Galili *et al.*, 1988, Rother et Squinto, 1996). En effet, environ 1% des IgG humaines présentes dans la circulation sanguine reconnaissent spécifiquement le
30 disaccharide Gal α 1-3Gal, que cet épitope soit porté par des glycoprotéines (Castronovo *et al.*, 1987; Towbin *et al.*, 1987) ou des glycosphingolipides (Galili *et al.*, 1984, 1985 et 1987).

Par ailleurs, il est connu qu'à la surface des hématies et des cellules épithéliales humaines et animales, constituant les membranes des tissus, se
35 trouvent des glycolipides possédant le disaccharide Gal α 1-4Gal, parmi lesquels le galabiosyl céramide, les antigènes P^k, P et P1.

Ce disaccharide Gal α 1-4Gal est la structure reconnue par des bactéries, des toxines bactériennes et des virus dans le cadre du processus d'adhésion de

ces derniers sur les membranes. Ce disaccharide pourrait s'il était utilisé en tant que médicament, empêcher ce phénomène d'adhésion par un mécanisme de compétition.

5 Cependant, les trop faibles rendements des procédés de synthèse chimique des épitopes α -galactosylés en général, et plus particulièrement des disaccharides Gal α 1-3Gal et Gal α 1-4Gal susmentionnés, ne permettent pas d'envisager une application industrielle de ces composés, notamment dans le cadre de la prévention des rejets de greffe dans le cas du disaccharide Gal α 1-3Gal, ou en tant que probiotique ou facteur de croissance dans le cas du disaccharide Gal α 1-4Gal.

10 La présente invention découle de la découverte faite par les Inventeurs, que, contrairement à ce que le laisse suggérer l'état de la technique décrit ci-dessus sur ce sujet, les cellules d'insectes expriment des enzymes à activité α -galactosyltransférase participant à la synthèse de composés α -galactosylés.

15 La présente invention a pour but de fournir de nouveaux procédés enzymatiques de préparation de composés α -galactosylés.

L'invention a également pour but de fournir de nouveaux composés α -galactosylés tels qu'obtenus par mise en oeuvre de ces procédés.

20 L'invention a plus particulièrement pour but de fournir de nouveaux médicaments contenant des composés α -galactosylés susmentionnés, notamment des composés comportant la structure Gal α 1-4Gal susmentionnée.

25 L'invention a également pour but de fournir de nouvelles méthodes de prévention ou de traitement des infections bactériennes ou virales par administration chez l'homme ou l'animal de compositions pharmaceutiques comprenant lesdits composés comportant la structure Gal α 1-4Gal susmentionnée.

30 L'invention a également pour but de fournir de nouveaux compléments nutritionnels, ou de nouvelles compositions alimentaires, comprenant lesdits composés comportant la structure Gal α 1-4Gal susmentionnée, et susceptibles d'être utilisés en nutrition humaine ou animale.

Les principales abréviations utilisées dans ce qui précède et ce qui suit, sont les suivantes :

- les monosaccharides :

| abréviation | nom | nom détaillé |
|-------------|------------------------|-------------------------------------|
| 35 Glc | Glucose | D-glucopyranose |
| GlcNAc | N-acétyl-D-glucosamine | 2-Acétamido-2-déoxy-D-glucopyranose |
| Gal | Galactose | D-galactopyranose |

| | | |
|--------|--------------------------|---------------------------------------|
| GalNAc | N-acétyl-D-galactosamine | 2-Acétamido-2-déoxy-D-galactopyranose |
|--------|--------------------------|---------------------------------------|

| | |
|-------|-----------------------------|
| NeuAc | acide N-acétyl-neuraminique |
|-------|-----------------------------|

- le glycosylnucléotide donneur

5 UDP-Gal Uridine 5'-diphospho-galactose

- le disaccharide Gal α 1-4Gal en position terminale, ou à l'intérieur d'un oligosaccharide est appelé : galabiose

- α et β correspondent aux anoméries de la liaison acétalique.

10 La présente invention a pour objet l'utilisation d'enzymes à activité α -galactosyltransférase provenant de cellules d'insectes, pour la mise en oeuvre d'un procédé enzymatique de préparation de composés α -galactosylés.

Par procédé enzymatique de préparation de composés α -galactosylés, on entend tout procédé comprenant une étape de transfert, par l'intermédiaire d'une liaison α , d'un résidu de galactose sur un résidu terminal de galactose d'un substrat déterminé.

15 La liaison en α des deux résidus de galactose susmentionnés, conduit à la formation d'une structure de formule Gal α 1-nGal dans laquelle n correspond à la position de l'atome de carbone, du résidu de galactose terminal dudit substrat, porteur de l'hydroxyle sur lequel s'effectue la liaison avec le résidu de galactose transféré. Par conséquent n représente 1, 2, 3, 4, ou 6.

20 Cette structure de formule Gal α 1-nGal peut être soit en position terminale non réductrice dans les composés α -galactosylés ainsi obtenus, soit en position interne dans lesdits composés α -galactosylés lorsque le procédé de préparation de ces derniers comprend une étape supplémentaire de liaison, par voie chimique ou enzymatique, d'un produit déterminé (désigné ci-après R1) au résidu de galactose identifié par l'expression Gal α 1 dans la formule de la structure susmentionnée.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de l' α 1,4-galactosyltransférase provenant de cellules d'insectes, pour la mise en oeuvre d'un procédé de préparation de composés α 1,4-galactosylés, ledit procédé comprenant une étape de transfert d'un résidu de galactose, par l'intermédiaire d'une liaison- α 1,4, sur un résidu terminal de galactose d'un substrat déterminé, de manière à obtenir un composé α -galactosylé comportant un disaccharide Gal α 1-4Gal en position terminale non réductrice.

30 L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée d'enzymes à activité α -galactosyltransférase provenant de cellules d'insectes, caractérisée en ce que lesdites enzymes sont celles exprimées dans les cellules d'insectes et

directement produites dans le milieu réactionnel dans le cadre de la mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention.

5 A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de cellules d'insectes en tant que source d'enzymes à activité α 1,4-galactosyltransférase, pour la mise en oeuvre d'un procédé enzymatique de préparation tel que décrit ci-dessus.

10 L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée d'enzymes à activité α -galactosyltransférase provenant de cellules d'insectes, caractérisée en ce que lesdites enzymes sont contenues dans des extraits cellulaires obtenus à partir de cellules d'insectes.

Avantageusement les cellules d'insectes utilisées dans les procédés enzymatiques susmentionnés, ou à partir desquelles sont obtenus les extraits cellulaires susmentionnés, sont des cellules de lépidoptères.

15 Notamment, les cellules de lépidoptères utilisées dans le cadre de la présente invention, sont celles des espèces suivantes :

- *Spodoptera*, tel que *Spodoptera frugiperda*,
- *Mamestra*, tel que *Mamestra brassicae*,
- *Trichoplusia*, tel que *Trichoplusia ni*.

20 De préférence, les cellules d'insectes utilisées dans le cadre de la présente invention sont des cellules de *Mamestra*, tel que *Mamestra brassicae*, et plus particulièrement celles de la lignée cellulaire de *Mamestra brassicae* déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2045, le 26 juin 1998.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, d'une enzyme à activité α 1,4-galactosyltransférase provenant de cellules d'insectes, notamment de lépidoptères définis ci-dessus, et avantageusement de cellules de *Mamestra* décrites ci-dessus, pour la mise en oeuvre d'un procédé enzymatique de préparation de composés α 1,4-galactosylés comprenant une étape de transfert d'un résidu de galactose, par l'intermédiaire d'une
30 liaison- α 1,4, sur un résidu terminal de galactose d'un substrat déterminé, de manière à obtenir un produit comportant le disaccharide Gal α 1-4Gal en position terminale non réductrice.

Avantageusement les lignées cellulaires d'insectes utilisées dans le cadre de la présente invention peuvent être obtenues de la manière suivante :

- 35
- obtention des explants, notamment par prélèvement de tissus adipeux, d'ovaires, de tissus embryonnaires, d'hémolymphie, ou de disques imaginaux,
 - mise en culture des explants dans un milieu de culture approprié,

- changement du milieu de culture toutes les semaines pendant huit mois environ,

- repiquage hebdomadaire de la lignée permanente ainsi obtenue,

- clonage en vue de l'établissement d'une lignée particulière.

5 Différentes méthodes d'obtention de lignées cellulaires d'insectes sont décrites de façon détaillée dans les revues suivantes :

- Thèse de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, soutenue le 5 juin 1975 par Jean-Marie Quiot, "Recherches sur la culture *in vitro* de cellules d'insectes et l'action de germes entomopathogènes en culture cellulaire", enregistrée à la bibliothèque centrale du Centre National de la Recherche Scientifique sous le numéro A.O. 10.963,

10 - K. Aizawa, "Cell culture of Lepidoptera", paru dans Invertebrate Tissue Culture, édité par C. Vago, Academic Press New York and London (1971).

15 L'invention concerne également les extraits cellulaires susmentionnés à activité α -galactosyltransférase, notamment à activité α 1,4-galactosyltransférase, tel qu'obtenu à partir de cellules d'insectes définies ci-dessus.

Avantageusement les extraits cellulaires selon l'invention, sont obtenus par mise en oeuvre du procédé suivant :

20 - lyse des cellules d'insectes, notamment des cellules de lépidoptères définies ci-dessus, par exemple par ultrasonication,

- centrifugation du lysat cellulaire à basse vitesse, notamment à 13000 g pendant 10 mn à 4°C,

- ultracentrifugation, notamment à 120000 g pendant 1 h à 4°C, du surnageant obtenu à l'étape de centrifugation précédente,

25 - élimination du surnageant obtenu à l'étape d'ultracentrifugation précédente, et récupération du culot de microsomes, ledit culot étant le cas échéant remis en suspension, notamment dans une solution de saccharose à 0,25 M et NaCl à 0,2 M, et pouvant être conservé à -80°C.

30 L'invention a également pour objet tout procédé enzymatique de préparation de composés α 1,4-galactosylés tels que définis ci-dessus, comprenant une étape de transfert d'un résidu de galactose sur un résidu terminal de galactose d'un substrat déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

35 - la réaction d'UDP-Gal avec ledit substrat en présence d'une enzyme à activité α -galactosyltransférase provenant de cellules d'insectes,

- le cas échéant la purification du produit obtenu lors de la réaction précédente.

Selon un mode particulièrement avantageux de réalisation du procédé enzymatique susmentionné de l'invention, la réaction d'UDP-Gal avec le substrat est effectuée en présence de cellules d'insectes, telles que décrites ci-dessus, exprimant l'enzyme à activité α -galactosyltransférase nécessaire à ladite réaction.

Avantageusement encore, le procédé enzymatique susmentionné de l'invention, est caractérisé en ce que la réaction d'UDP-Gal avec le substrat est effectuée en présence d'un extrait cellulaire tel que défini ci-dessus.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, les cellules d'insectes utilisées dans le cadre du procédé enzymatique susmentionné, sont avantageusement celles de lignées cellulaires telles qu'obtenues selon le procédé défini ci-dessus, et sont de préférence des cellules de lépidoptères appartenant notamment aux espèces suivantes :

- *Spodoptera*, tel que *Spodoptera frugiperda*,
- *Mamestra*, tel que *Mamestra brassicae*, et plus particulièrement des cellules de la lignée cellulaire de *Mamestra brassicae* déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2045, le 26 juin 1998,
- *Trichoplusia*, tel que *Trichoplusia ni*.

L'invention a plus particulièrement pour objet, tout procédé tel que décrit ci-dessus, de préparation de composés α -galactosylés comportant, en position terminale non réductrice, une structure de formule $\text{Gal}\alpha 1\text{-nGal}$ dans laquelle n est tel que défini ci-dessus.

L'invention vise plus particulièrement tout procédé tel que décrit ci-dessus, de préparation de composés $\alpha 1,4$ -galactosylés tels que définis ci-dessus, dans lequel l'étape de réaction de l'UDP-Gal avec ledit substrat est effectuée en présence d'une enzyme à activité $\alpha 1,4$ -galactosyltransférase.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout procédé tel que décrit ci-dessus de préparation de composés $\alpha 1,4$ -galactosylés, par transfert d'un résidu de galactose, par l'intermédiaire d'une liaison- $\alpha 1,4$, sur un résidu terminal de galactose d'un substrat déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la réaction d'UDP-Gal avec ledit substrat en présence d'une enzyme à activité $\alpha 1,4$ -galactosyltransférase telle qu'obtenue à partir de cellules d'insectes, pour obtenir un composé $\alpha 1,4$ -galactosylé comprenant le disaccharide $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ en position terminale non réductrice,
- le cas échéant la purification dudit composé $\alpha 1,4$ -galactosylé ainsi obtenu.

Avantageusement, le procédé susmentionné est effectué de telle manière que la réaction d'UDP-Gal avec le substrat est effectuée en présence de cellules d'insectes exprimant l'enzyme à activité α 1,4-galactosyltransférase nécessaire à ladite réaction.

Les cellules d'insectes productrices de l'enzyme à activité α 1,4-galactosyltransférase, et utilisées dans le procédé susmentionné, sont de préférence celles de lignées cellulaires telles qu'obtenues selon le procédé défini ci-dessus. Avantageusement lesdites cellules d'insectes sont des cellules de *Mamestra*, tel que *Mamestra brassicae*, et plus particulièrement des cellules de la lignée cellulaire de *Mamestra brassicae* déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2045, le 26 juin 1998.

Selon un autre mode de réalisation du procédé susmentionné, la réaction d'UDP-Gal avec le substrat est effectuée en présence d'un extrait cellulaire tel que défini ci-dessus, et obtenu à partir de cellules d'insectes productrices de l'enzyme à activité α 1,4-galactosyltransférase, selon le procédé susmentionné.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout procédé tel que décrit ci-dessus de préparation de composés α -galactosylés, caractérisé en ce que :

* le substrat est un composé de formule :

$\text{Gal}\beta 1\text{-n}_0\text{X-R}$

dans laquelle :

- n_0 correspond à la position, sur le résidu X défini ci-après, du carbone porteur de l'hydroxyle sur lequel s'effectue la liaison avec le résidu terminal de β -D-galactopyranose dudit substrat (représenté par $\text{Gal}\beta 1$ dans la formule ci-dessus), et représente 1, 2, 3, 4, ou 6, de préférence n_0 représente 3 ou 4, et

- X représente un oside, notamment un résidu de galactose, ou de glucose, ou de N-acétyl-D-galactosamine ou de 2-O-acétyl-D-galactopyranose,

- R représente :

- . un atome d'hydrogène,
- . un monosaccharide ou un oligosaccharide,
- . un oside ou oligoside porteur à leur extrémité réductrice d'un aglycone tel que défini ci-dessous,
- . un aglycone, tel qu'un groupe benzyle ou phényle, substitué ou non, notamment un groupe paranitrophényle, ou un groupe alkyle de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe $-(\text{CH}_2)_m\text{-CH}_3$ dans lequel m représente 0 ou un nombre entier de 1 à 7,

. une glycoprotéine, notamment une glycoprotéine substituée par des O-glycannes, telle que l'asialo-fétuine,

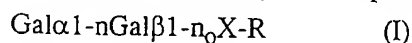
un acide aminé, un peptide, une protéine, ou une néoglycoprotéine, notamment l'albumine sérique bovine chimiquement couplée à un oligoside,

un glycolipide, notamment le lactosylcéramide de formule $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$, le $\text{G}_{\text{M}3}$ de formule $\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$, le $\text{G}_{\text{D}3}$ de formule $\text{NeuAc}\alpha 2-8\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$,

un lipide, un céramide,

un support multivalent non immunogène, notamment un dérivé de polyacrylamide, ou une polylysine, dont les fonctions amines des chaînes latérales sont substituées par des groupes de formule $\text{Gal}\beta 1-n_{\text{O}}\text{X-}$ dans laquelle n_{O} et X sont tels que définis ci-dessus,

* le produit obtenu est un composé de formule (I) suivante :



dans laquelle n_{O} X et R sont tels que définis ci-dessus, et n correspond à la position de l'atome de carbone, du résidu de galactose terminal dudit substrat, à savoir du résidu de β -D-galactopyranose dudit substrat (représenté par $\text{Gal}\beta 1$ dans la formule ci-dessus), porteur de l'hydroxyle sur lequel s'effectue la liaison avec le résidu de galactose transféré (représenté par $\text{Gal}\alpha 1$ dans la formule ci-dessus).

L'invention concerne plus particulièrement tout procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que le substrat est choisi parmi les composés suivants :

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$,

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-bn}$,

$\text{Gal}\beta 1-3(2\text{-O-Ac})\text{Gal}\beta 1\text{-O-Me}$,

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1\text{-O-octyl}$,

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$,

$\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$,

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$,

$\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$,

$\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$,

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$,

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4(\text{NeuAc}\alpha 2-3)\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$,

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4(\text{NeuAc}\alpha 2-8\text{NeuAc}\alpha 2-3)\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$,

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Ser/Thr}$.

(Ac = acétyle, bn = benzyle, Me = méthyle, Cer = céramide)

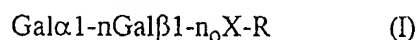
Avantageusement, ledit substrat est choisi parmi les composés suivants :

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$,

$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-bn}$,

$\text{Gal}\beta 1-3(2\text{-O-Ac})\text{Gal}\beta 1\text{-O-Me}$.

L'invention a également pour objet les composés α -galactosylés de formule (I) suivante :



dans laquelle n, n_0 X et R sont tels que définis ci-dessus.

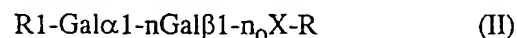
5 L'invention a plus particulièrement pour objet les composés α -galactosylés susmentionnés de formule (I) dans laquelle $n = 4$.

Des composés $\alpha 1,4$ -galactosylés susmentionnés particulièrement préférés sont ceux répondant aux formules suivantes :

- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3GalNAc,
- 10 Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3GalNAc $\alpha 1$ -O-bn,
- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3(2-O-Ac)Gal $\beta 1$ -O-Me,
- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3GlcNAc $\beta 1$ -O-octyl,
- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3GlcNAc,
- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -4Glc,
- 15 Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc,
- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -4GlcNAc,
- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -4GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc,
- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3GalNAc $\beta 1$ -4Gal $\beta 1$ -4Glc $\beta 1$ -Cer,
- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3GalNAc $\beta 1$ -4(NeuAc $\alpha 2$ -3)Gal $\beta 1$ -4Glc $\beta 1$ -Cer,
- 20 Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3GalNAc $\beta 1$ -4(NeuAc $\alpha 2$ -8NeuAc $\alpha 2$ -3)Gal $\beta 1$ -4Glc $\beta 1$ -Cer,
- Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ -3GalNAc $\alpha 1$ -O-Ser/Thr.

L'invention concerne également tout procédé, tel que décrit ci-dessus, de préparation de composés α -galactosylés comportant une structure de formule Gal $\alpha 1$ -nGal définie ci-dessus, en position interne, ledit procédé étant effectué
25 suivant les mêmes étapes que celles des procédés décrits ci-dessus, et comprenant une étape supplémentaire de liaison, par voie chimique ou enzymatique, d'un produit déterminé (R1) au résidu terminal de galactose identifié par l'expression Gal $\alpha 1$ dans la formule de la structure susmentionnée.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les composés α -galactosylés de formule (II) suivante :



dans laquelle n, n_0 X et R sont tels que définis ci-dessus, et R1 représente un oside ou oligoside.

L'invention concerne plus particulièrement les composés α -galactosylés de formule (II) susmentionnée, et correspondant aux formules suivantes :

- GalNAc $\beta 1$ -3Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ - n_0 X-R,
- GalNAc $\alpha 1$ -3GalNAc $\beta 1$ -3Gal $\alpha 1$ -4Gal $\beta 1$ - n_0 X-R,
- dans lesquelles n, n_0 X et R sont tels que définis ci-dessus.

5 L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un composé α -galactosylé, tel qu'obtenu par mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, et plus particulièrement au moins un composé de formule (I) ou (II) susmentionnée, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention, sont davantage caractérisées en ce qu'elles se présentent sous une forme administrable par voie orale ou parentérale, et comprennent notamment entre environ 1 mg à environ 10 g de composé α -galactosylé selon l'invention.

10 Avantageusement, les compositions pharmaceutiques selon l'invention, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent également un ou plusieurs antibiotiques.

15 L'invention concerne également l'utilisation de composés α -galactosylés, tels qu'obtenus par mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, et plus particulièrement de composés de formule (I) ou (II) susmentionnée, pour la préparation de médicaments destinés à la prévention ou au traitement d'infections bactériennes ou virales, chez l'homme ou l'animal.

20 L'invention a plus particulièrement pour objet, l'utilisation de composés α -galactosylés susmentionnés, pour la préparation de médicaments destinés à la prévention ou au traitement des infections par :

- les souches d'*Escherichia coli* uropathogènes,
- les souches d'*Escherichia coli* exprimant les G-adhésines sur leurs *P-fimbriae*,
- les souches de *Streptococcus suis* qui sont responsables de méningites chez le porc et l'homme,
- la Vero toxine d'*Escherichia coli* qui peut contaminer les viandes bovines et ovines et provoquer des diarrhées hémorragiques et des insuffisances rénales aiguës chez les consommateurs.

25 30 L'invention a également pour objet l'utilisation de composés α -galactosylés, tels qu'obtenus par mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, et plus particulièrement de composés de formule (I) ou (II) susmentionnée, pour la préparation de compositions alimentaires utilisables dans le domaine de la nutrition animale ou humaine.

35 A ce titre, l'invention a pour objet toute composition alimentaire comprenant au moins un composé α -galactosylé tel que décrit ci-dessus.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de procédés de préparation de composés α -galactosylés de l'invention, et de l'étude de leurs propriétés biologiques.

Les épitopes α -galactosylés étant fortement antigéniques chez l'homme, les Inventeurs ont recherché la présence de glycannes porteurs de résidus α -galactosylés (en position terminale non réductrice) sur les glycoprotéines endogènes des lignées cellulaires d'insectes. En effet, les modifications post-traductionnelles subies par les protéines et particulièrement la glycosylation sont sous la dépendance de l'équipement enzymatique propre à chaque lignée cellulaire et le plus souvent, la fraction glycannique des glycoprotéines recombinantes garde une information spécifique issue du système qui l'a produite. Après séparation par SDS-PAGE et électrotransfert des protéines présentes dans des lysats de cellules d'insectes saines (non infectées par le baculovirus), la recherche des épitopes α -galactosylés substituant les glycoprotéines endogènes a été réalisée sur la base de la fixation sur les glycoprotéines d'une lectine végétale, la lectine *Bandeiraea simplicifolia* lectine-I isolectine B₄ (BSI-B₄), spécifique des disaccharides Gal α 1-3/4Gal en position terminale non réductrice (Hayes *et al.*, 1974; Murphy *et al.*, 1977; Wu *et al.*, 1995). Toutes les lignées de lépidoptères testées se sont avérées posséder des glycoprotéines endogènes dont la fraction glycannique est reconnue spécifiquement par la BSI-B₄. Les Inventeurs se sont plus particulièrement intéressés à la lignée *Mamestra brassicae* (Mb), car celle-ci s'est avérée posséder les glycoprotéines les plus fortement reconnues par la BSI-B₄. Ainsi, une activité α 1,4-galactosyltransférase chez Mb qui catalyse le transfert d'un résidu de α -Gal sur les accepteurs Gal β 1-3GalNAc-R, a été mise en évidence.

I) Matériels et méthodes

1) Matériels

Tous les produits utilisés sont de qualité analytique. L'UDP-[6-³H]-Gal (650 GBq/mmol) provient d'Amersham (France), ce glycosyl-nucléotide radioactif a été dilué avec de l'UDP-Gal non-radioactive achetée chez Sigma (St Louis, MO, USA). La BSI-B₄ couplée à la peroxydase, les tablettes de DAB (substrat insoluble de la peroxydase), la BSI-B₄, les substrats G_{M1a} (Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-Cer), G_{A1} (Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer), G_{D1b} (Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-Cer), G_{M2} (GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-Cer), Gal β 1-3GalNAc α -O-bn, lactose (Gal β 1-4Glc), Gal, Gal α 1-pNp, Gal β 1-pNp, Gal α 1-O-Me, la févine, l'angiotensine I et le Triton X-100 proviennent de chez Sigma. La N-acétyllactosamine (Gal β 1-4GlcNAc) et la N-acétyl-isolactosamine (Gal β 1-3GlcNAc) proviennent de chez Calbiochem (CA, USA). Le Lacto-N-tétraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) et le lacto-N-néotétraose (Gal β 1-

4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) ont été préparés à partir de colostrum bovin (Paulson *et al.*, 1978). Le Lactosylcéramide (Gal β 1-4Glc β 1-Cer), et le substrat Gal β 1-3GalNAc proviennent de chez Sigma. Les substrats Gal β 1-3(2-O-Ac)Gal β 1-O-Me et Gal β 1-3GlcNAc β 1-O-octyl sont synthétisés au laboratoire. L'asialo-fétuine a été obtenu après hydrolyse acide de la fétuine. La désialylation de la fétuine a été contrôlée en réalisant une composition en monosaccharides de l'asialo-glycoprotéine après méthanolyse, triméthylsililation et séparation des monosaccharides dérivés par chromatographie en phase gazeuse. Les supports de chromatographie Dowex 1x2 (forme Cl⁻, 100-200 mesh), Bio-Gel P-2 (200-400 mesh) et P-4 (200-400 mesh) proviennent de chez BioRad (France). Les cartouches Sep-Pak C₁₈ proviennent de chez Waters Corp. (Milford, MA, USA). La membrane de nitrocellulose BioTrace NT a été achetée chez Gelman Sciences. Les anticorps monoclonaux murins anti-P₁, anti-P^k, anti-P, et les érythrocytes provenant d'individus du groupe sanguin P / P₁ proviennent de l'Institut National de la Transfusion Sanguine (Paris, France).

2) Culture des cellules d'insectes et préparation des homogénats cellulaires

Le clone *Spodoptera frugiperda* Sf-9 issu de la lignée cellulaire IPLB-Sf-21-AE (Vaughn *et al.*, 1977) provient de l'ATCC (CRL 1711) et le clone *Trichoplusia ni* Tn-5-B14 provient de l'ATCC (CRL 10.859). Le clone *Mamestra brassicae* SPCMb-92-C6 a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2045, le 26 juin 1998. Les trois lignées cellulaires ont été adaptées, maintenues et cultivées à 28°C dans le milieu de culture EX-CELL 401 (Sera-Lab, UK). Le milieu EX-CELL 401 permet de cultiver les lignées cellulaires d'insectes en absence totale de sérum.

Les cellules ont été récoltées à confluence et les homogénats cellulaires ont été obtenus après lyse des cellules à 0°C dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 6,5 contenant 1 % de Triton X-100, 20 % de glycérol, 0.5 mM de dithiothréitol et 5 mM de MnCl₂ (1 ml pour 3 x 10⁷ cellules). Après 10 minutes d'incubation sous agitation, les homogénats cellulaires sont centrifugés 10,000 g pendant 15 minutes. Les protéines contenues dans ces surnageants seront séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). La mesure de la concentration en protéines dans chaque homogénat cellulaire (surnageant après centrifugation) a été réalisée par la méthode décrite par Peterson (1977) en utilisant l'albumine bovine sérique pour réaliser la gamme étalon.

3) Electrophorèse et Western blot

La séparation par SDS-PAGE des protéines contenus dans les homogénats cellulaires a été réalisée en conditions réductrices et en utilisant un gel formé d'un gradient de 4 % à 20 % de polyacrylamide. Pour chaque homogénat cellulaire 40 μ g de protéines sont déposés par puits. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (blot) comme décrit par Vaessen *et al.* (1981). Les dépôts ayant été réalisés en double, le blot est coupé en deux moitiés identiques. Les deux parties sont tout d'abord mis en présence de polyvinylpyrrolidone (2 % in TBS) puis incubées avec la BSI-B₄ couplée à la peroxydase (2 μ g / ml in TBS contenant 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) avec ou sans la présence de sucre compétiteur 0.5 M α Me-Gal. Après lavage, les glycoprotéines reconnues par la lectine ont été mises en évidence en utilisant le protocole de Sigma *Fast staining* qui utilise du DAB et de l'Urée / H₂O₂

4) Préparation des microsomes et mesure des activités enzymatiques

2 x 10⁸ cellules de la lignée Mb cultivées dans le milieu EX-CELL 401 ont été remises en suspension dans 10 ml de 0.25 M sucrose / 0.2 M NaCl à 0°C puis lysées par ultrasonication, 5 impulsions en maintenant la température égale à 0°C. Pour obtenir des microsomes, le lysat cellulaire a été centrifugé à basse vitesse 13.000g pendant 10 minutes à 4°C, puis le surnageant a subi une ultracentrifugation à 120.000g pendant 1 heure à 4°C. Après avoir éliminé le surnageant, le culot de microsomes a été remis en suspension dans du 0.25 M sucrose / 0.2 M NaCl et conservé à -80°C.

Tous les essais ont été réalisés au moins en double. L'incorporation de [6-³H]-Gal a été déterminée après soustraction de la radioactivité mesurée en absence d'accepteur exogène. Pour chaque activité mesurée, le résultat représente la valeur moyenne des différents essais exprimée en nmol de résidus de Gal transférés par mg de protéines et par heure.

Les conditions finales de chaque essai étaient les suivantes : un volume final de 50 μ l; fraction microsomale (35 μ g de protéines); tampon MES 0,125 M pH 7,0; 0,15 % de Triton X-100; 5 mM de γ -galactonolactone; 10 mM d'ATP; 12,5 mM de MnCl₂; 1 mM d'UDP-[6-³H]-Gal (235 MBq / mmol; 11,75 kBq / 50 μ l); suivant le type d'accepteur utilisé 4 mM d'oligosaccharide ou d'aryl-glycoside, 1 mM de ganglioside, ou 2 mg / ml de glycoprotéine. Enfin, chaque essai était incubé 1 heure à 37°C.

Afin de séparer le donneur radioactif (UDP-[³H]-Gal) du produit formé plusieurs méthodes ont été utilisées en fonction du type de substrat accepteur utilisé. Pour les accepteurs de type oligosaccharidique, les réactions ont été stoppées par addition de 0,5 ml d'H₂O et les produits ayant incorporés le [³H]-Gal ont été recueillis après chromatographie échangeuse d'ions sur une colonne de 1 ml de Dowex 1x2 (forme-Cl⁻, 100-200 mesh) équilibrée en eau. La mesure de la radioactivité des produits formés a été effectuée par comptage à scintillation (Vandamme *et al.*, 1992). Dans le cas de l'utilisation de glycoprotéines comme accepteurs, les réactions ont été stoppées par addition de 1 ml d'acide phosphotungstique glacial (5 % dans HCl 2 M). Les précipités formés ont été retenus sur des filtres en fibre de verre, lavés successivement avec une solution à 5 % d'acide trichloroacétique, de l'eau distillée et de l'éthanol. Les filtres pouvaient alors subir un comptage à scintillation (Vandamme *et al.*, 1992). Dans le cas de l'utilisation d'aryl-glycoside et de glycolipides comme accepteurs, les réactions ont été stoppées par addition de 1 ml d'éthanol. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 3.000 g pendant 5 minutes, puis les surnageants ont été déposés sur des colonnes Sep-Pak C₁₈. Après lavage par 5 ml d'eau, les aryl-glycosides ont été élués par 5 ml d'une solution aqueuse contenant 30 % d'acétonitrile. Quant aux glycolipides, après lavage avec 5 ml d'eau puis addition de 2 ml de méthanol, les éluations étaient réalisées par 5 ml de chloroforme / méthanol (1/1, vol./vol.). Enfin, comme précédemment la mesure de la radioactivité était effectuée par comptage à scintillation (Vandamme *et al.*, 1992). La durée des réactions enzymatiques étant limitée à 1 heure, nous avons considéré que les réactions étaient linéaires (vitesse initiale constante). Pour la détermination des paramètres cinétiques (K_M et V_{Max}), les incubations ont été réalisées pendant 1 heure en présence de concentrations variables (0.125 - 4 mM) des accepteurs Galβ1-3GalNAcα1-O-bn et Galβ1-3GlcNAcβ1-O-octyl.

5) *Préparation d'une importante quantité du produit obtenu après transfert de Gal sur l'accepteur Galβ1-3GalNAcα1-O-bn*

Les conditions de la réaction ont été semblables à celles décrites précédemment. Toutefois, les modifications ont été les suivantes : un volume final de 600 µl; fraction microsomale (850 µg de protéines); 4 mM d'UDP-[6-³H]-Gal (62 MBq / mmol; 0,148 MBq / 600 µl); 4 mM de Galβ1-3GalNAcα1-O-bn. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 24 h à 37°C. Puis, le mélange réactionnel a été déposé sur Sep-Pak C₁₈, l'éluion a été réalisée comme décrit précédemment, puis le produit formé (en mélange avec l'accepteur restant) a été

lyophilisé. Des aliquotes (5 µl) du mélange réactionnel ont été prélevés tout au long de l'incubation à 0, 2, 4, 8, et 24 heures et la mesure de la radioactivité transférée a été effectuée. Le pourcentage de transfert après 24 heures d'incubation était de 66 % (ce qui correspond à environ 970 µg de produit galactosylé formé).

5 Le produit purifié a été ensuite analysé par RMN et MS.

Pour réaliser les étude d'immunoréactivité, 4 mg du produit galactosylé avec 90 % de pureté, ont été produits. Cette seconde préparation en grande quantité a été réalisée comme décrit précédemment, dans un volume final de 1,85 ml (1,4 mg de protéines provenant des microsomes de *Mb*) et une
10 incubation à 37°C pendant 48 heures.

6) *Analyse par RMN bi-dimensionnelle homonucléaire et hétéronucléaire*

L'analyse par spectroscopie RMN-¹H a été réalisée sur un spectromètre Brüker ASX 400WB transformé de Fourier et contrôlée par un ordinateur
15 Aspect 3000. Les déplacements chimiques (δ) ont été mesurés par rapport à la référence interne en l'occurrence les protons de l'acétone à $\delta = 2.225$ ppm dans le D₂O à 25 °C. Le spectre COSY avec un ou deux relais et le spectre HMQC ont été réalisés en utilisant les séquences d'impulsions standard de Brüker.

20 7) *Spectrométrie de Masse à Désorption Laser (MALD-MS pour Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry) et Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (GC-MS pour Gas Chromatography-Mass Spectrometry)*

100 µg du produit galactosylé ont été perméthylés suivant Ciucanu et
25 Kerek (1984) puis analysés par MALD-MS. Ensuite, les composés méthylés ont été méthanolysés et les méthyl-glycosides formés ont été identifiés par GC-MS après peracétylation comme décrit par Fournet *et al.* (1981).

Le poids moléculaire du produit galactosylé et perméthylé a été mesuré par MALD-MS sur un appareil à temps de vol Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen, Germany) équipé d'un laser à azote de longueur d'onde d'émission
30 337 nm. Les spectres sont mesurés en mode positif avec une énergie d'accélération de 6 keV. Les échantillons ont été préparés en mélangeant, directement sur la cible, 1 µl de la solution à analyser (environ 50 pmol) avec 1 µl d'une solution de matrice (12 mg / ml d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque
35 dissous dans un mélange méthanol / eau, 70:30) puis la cristallisation s'est déroulée à température ambiante. Une calibration externe a été réalisée avec l'angiotensine I standard (PM : 1296.7). 10 accumulations ont été nécessaires pour obtenir le spectre de masse.

La séparation en GC des méthyl-monosaccharides partiellement méthylés et acétylés, issus du produit de la réaction enzymatique, a été réalisée sur une colonne capillaire de silice provenant de SGE (0.32 mm x 25 m). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à une pression de 0,5 bar et une programmation de température (110-240°C et 3°C / minute). L'analyse par GC-MS a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse (Delsi DI 700) couplée à un spectromètre de masse de type quadripôle (Nermag R10-10, Rueil Malmaison, France). L'ionisation par impact électronique utilise une énergie d'ionisation de 70 eV et un courant d'ionisation de 0,2 mA.

8) *Libération des O-glycannes de l'asialo-fétuine après que cette asialo-glycoprotéine ait servi d'accepteur de [6-³H]-Gal*

1,25 mg d'asialo-fétuine (concentration finale : 5 mg / ml) ont été incubés pendant 24 heures à 37°C, dans des conditions identiques à celles décrites précédemment, une fraction microsomale de Mb (210 µg de protéines) et 0,5 mM d'UDP-[6-³H]-Gal (0,57 GBq / mmol; 74 kBq / µl). Après incubation, la glycoprotéine est séparée de l'excès d'UDP-[6-³H]-Gal par tamisage moléculaire sur une colonne de Bio-Gel P2 (200-400 mesh) équilibrée avec 0,1 M d'acétate de pyridine pH 5,6. Ensuite, L'asialo-fétuine marquée-[³H] a été placée dans un milieu alcalin et réducteur contenant 0,1 M de NaOH avec 1 M de NaBH₄ pendant 48 heures à 45°C (Spiro and Bhoyroo, 1974). Par la suite l'échantillon est amené à pH 6 par addition d'une résine échangeuse d'ions Dowex 50 x 8 (forme-H⁺, 20-50 mesh) puis évaporé. La glycoprotéine est alors remise en suspension dans du méthanol et évaporée (3 fois). L'échantillon est ensuite remis en suspension dans de l'eau et déposé sur une colonne Bio-Gel P4 (80 x 1,2 cm, 200-400 mesh) équilibrée avec une solution d'acétate de pyridine à 0,1 M pH 5,6. Cette étape permet de séparer par tamisage moléculaire les O-glycannes libérés et les N-glycopeptides.

9) *Immunoréactivité du produit formé Galα1-4Galβ1-3GalNAcα-O-bn*

Les anticorps monoclonaux murins anti-P₁, anti-P^k, anti-P et la lectine BSI-B₄ ont été testés en plaques de Takatski sur des hématies humaines papainées de phénotypes P₁, P^k₁, P^k₂ et p (Tja-témoin négatif). Les conditions finales choisies pour réaliser les tests d'hémagglutination sont les suivantes : des suspensions d'hématies à 0,7 % en NaCl 150 mM, un tampon PBS pH 6,8, durée de mise en contact 7 minutes à une température de 37°C. Pour les essais avec la BSI-B₄ on ajoute 0,1 mM de CaCl₂ et 0,1 mM de MnCl₂. Cette analyse avait pour but de contrôler la spécificité des réactifs et de titrer le système

agglutinant afin de déterminer pour chaque anticorps monoclonal la dilution maximale permettant d'obtenir une agglutination. Chaque anticorps monoclonal P_1 , P_1^k , P_2^k où la lectine a été amené à la dilution appropriée est mis en contact avec des concentrations décroissantes de l'aryl-glycoside $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1-O\text{-bn}$ ou $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1-O\text{-bn}$ (témoin négatif) pendant 4 heures à 22 °C avant d'être mélangé avec les hématies papainées pour réaliser les tests d'inhibition des hémagglutination.

II) Résultats

1) Fixation de la BSI-B₄ sur les glycoprotéines de Mb

40 µg de protéines provenant des homogénats cellulaires de *Sf-9*, *Mb* et *Tn* cultivés dans le milieu EX-CELL 401 ont été séparés par SDS-PAGE et mise en présence de la BSI-B₄ couplée à la peroxydase. Les trois lignées cellulaires possèdent des glycoprotéines reconnues par la BSI-B₄. La fixation de la lectine est spécifique car en présence de 0.5 M du sucre compétiteur $\alpha\text{Me-Gal}$ on n'observe plus de fixation de la BSI-B₄.

Chaque lignée cellulaire a un profil de révélation par la BSI-B₄ qui lui est propre. Il apparaît que la fixation la plus importante de la BSI-B₄ est observé sur des glycoprotéines de la lignée *Mb*. C'est une bande comprise entre 100-110 kDa qui est la plus fortement révélée par la BSI-B₄ dans la lignée *Mb* et son intensité de coloration est même supérieure à celle des bandes révélées dans les lignées *Sf-9* et *Tn*. Dans la lignée *Sf-9*, la BSI-B₄ révèle une large bande comprise entre 95 et 105 kDa, avec deux signaux plus faibles à 85 et 190 kDa. La BSI-B₄ se fixe sur des glycoprotéines de la lignée *Tn* dont le poids moléculaire est compris entre 95 et 120 kDa, le signal le plus important étant observé entre 100-110 kDa. La BSI-B₄ reconnaissant spécifiquement les séquences $\text{Gal}\alpha 1-3/4\text{Gal}$ (Hayes *et al.*, 1974; Murphy *et al.*, 1977; Wu *et al.*, 1995), ces résultats indiquent que les trois lignées cellulaires *Sf-9*, *Mb* et *Tn* possèdent des glycoprotéines endogènes de haut poids moléculaires substituées par des glycannes qui portent des résidus $\alpha\text{-Gal}$ en position terminale non réductrice. Ces oligosaccharides $\alpha\text{-Galactosylés}$ sont les témoins de la présence d'activités $\alpha\text{-galactosyltransféra-siques}$ dans les trois lignées de lépidoptères. La fixation de la BSI-B₄ étant la plus importante sur les glycoprotéines de la lignée *Mb*, l'activité $\alpha\text{-galactosyltransféra-sique}$ dans cette lignée cellulaire d'insecte, a été étudiée.

2) *Mb* transfère préférentiellement du Gal en position terminale sur la séquence Gal β 1-3GalNAc.

Afin de caractériser une éventuelle activité α -galactosyltransférase chez *Mb*, des microsomes de *Mb* ont été incubés avec différents accepteurs potentiels dont le point commun était de posséder un résidu de Gal en position terminale non réductrice. Les résultats de ces expériences sont présentés dans le Tableau I. Il apparaît qu'il existe une activité galactosyltransférase dans la fraction microsomale de *Mb* qui transfère préférentiellement des résidus de Gal sur les accepteurs Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn, Gal β 1-3GalNAc, et même sur le substrat synthétique Gal β 1-3-(2-*O*-Ac)-Gal β 1-*O*-Me. La fraction microsomale de *Mb* a aussi la capacité de transférer des résidus de Gal sur la *N*-acétyl-isolactosamine (Gal β 1-3GlcNAc) ou Gal β 1-3GlcNAc β 1-*O*-octyl, mais les pourcentages de transfert sont plus faibles (respectivement 36,9 % et 39,9 %) que celui obtenu avec Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn. Comme nous l'indique le Tableau I, le transfert de résidus de Gal sur la *N*-acétyllactosamine (Gal β 1-4GlcNAc) ou le lacto-*N*-néotétraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) est respectivement 2,7 et 1,5 fois plus faible que celui mesuré avec la *N*-acétyl-néolactosamine (Gal β 1-3GlcNAc) ou le lacto-*N*-tétraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc). Cela démontre que l' α -galactosyltransférase de *Mb* catalyse préférentiellement le transfert de résidus de Gal sur des substrats accepteurs de type Gal β 1-3-R que de type Gal β 1-4-R. Remarquons, que le transfert de résidus de Gal sur le lactose (Gal β 1-4Glc) est très faible. De plus, le Gal, l' α - et le β -aryl-glycosides de Gal ne sont pas des substrats accepteurs de l'activité enzymatique étudiée. Ces résultats démontrent que la spécificité de substrat de l' α -galactosyltransférase présente chez *Mb* est totalement différente de l'UDP-Gal : Gal β 1-4GlcNAc α 1,3-galactosyltransférase précédemment purifiée et clonée dans différentes sources (Blanken and Van den Eijnden, 1985; Joziassse *et al.*, 1989; Joziassse *et al.*, 1992).

Tableau I. Détermination de la spécificité de substrat de l'activité UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransférase de *Mamestra brassicae* vis-à-vis d'accepteurs oligosaccharidiques. Les résultats sont exprimés en valeur relative par rapport à l'incorporation de résidus de Gal sur l'accepteur Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn pris comme référence.

| Substrat ^a | Activité relative (%) |
|---|----------------------------|
| Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn ^b | 100.0 (103.3) ^c |
| Gal β 1-3GalNAc | 84,7 |
| Gal β 1-3(2-O-Ac)Gal β 1-O-Me | 78.3 |
| Gal β 1-3GlcNAc β 1-O-octyl | 39.9 |
| Gal β 1-3GlcNAc | 36.9 |
| Gal β 1-4Glc | 15.2 |
| Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc | 13.7 |
| Gal β 1-4GlcNAc | 13.5 |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc | 9.3 |
| Gal β 1-pNp | 3.4 |
| Gal | 2.6 |
| Gal α 1-pNp | 1.6 |
| Gal α 1-O-Me | 0.2 |

^a Les substrats ont été utilisés à une concentration finale de 4 mM.

^b Ac, acétyl; bn, benzyl; pNp, p-nitrophénol

^c L'activité (nmol.h⁻¹.mg⁻¹) de la galactosyltransférase est indiquée entre parenthèses.

Deux familles de glycannes porteurs respectivement en position terminale non réductrice du disaccharides Gal β 1-3GalNAc ou Gal β 1-3GlcNAc semblent être toutes deux des substrats accepteurs de activité α -galactosyltransférase de *Mb*. Nous avons déterminé les paramètres cinétiques du transfert des résidus de Gal sur les substrats accepteurs Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn et Gal β 1-3GlcNAc β 1-O-octyl en utilisant comme source d'enzyme la fraction microsomale de *Mb*. Les résultats présentés dans le Tableau II montrent que la valeur du K_M obtenue avec Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn est 13-fois inférieure à celle mesurée avec Gal β 1-3GlcNAc β 1-O-octyl. De plus, l'activité relative V_{Max}/K_M est égale à 20 μ l.mg⁻¹.h⁻¹ avec Gal β 1-3GlcNAc β 1-O-octyl et à 330 μ l.mg⁻¹.h⁻¹ avec Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn, ce qui prouve incontestablement

que le disaccharide Gal β 1-3GalNAc est le meilleur substrat accepteur de l'activité α -galactosyltransférase de *Mb*.

Tableau II. Comparaison des paramètres cinétiques de l'activité UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransférase de la lignée *Mamestra brassicae* vis-à-vis des séquences Gal β 1-3GalNAc et Gal β 1-3GlcNAc.

| Substrat | K_M (mM) | V_{Max} (nmol.mg ⁻¹ .h ⁻¹) | V_{Max} / K_M ^a (μ l.mg ⁻¹ .h ⁻¹) |
|--|---------------|--|---|
| Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn ^b | 0.3 | 99.1 | 330 |
| Gal β 1-3GlcNAc β 1-O-octyl | 3.3 | 66.7 | 20 |

^a activité relative .

^b Ac, acétyl; bn, benzyl; pNp, p-nitrophénol.

3) Le résidu de Gal est lié en α 1,4- à l'extrémité non réductrice du disaccharide Gal β 1-3GalNAc

Afin de déterminer précisément la liaison (anomérie et substitution) du Gal transféré sur Gal β 1-3GalNAc par l'activité α -galactosyltransférase de *Mb*, le produit galactosylé issu du transfert de Gal sur le substrat accepteur Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn (composé A) a été analysé par RMN (Tableau III). Un spectre RMN réalisé avec l'accepteur Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn (composé A) a permis de déterminer l'ensemble des signaux caractéristiques du composé A et particulièrement ceux provenant de l'unité β -Gal en position terminale, δ = 4.454 ppm (H-1), δ = 3.620 ppm (H-3) et δ = 3.900 ppm (H-4). Les signaux correspondant au composé A sont retrouvés sur le spectre RMN obtenu avec le produit de la réaction enzymatique en association avec de nouvelles résonances provenant du composé néosynthétisé (composé B). Le rapport obtenu après intégration des signaux provenant du résidu en position terminale β -Gal_{II A} (δ H-1 = 4.454 ppm) et du résidu substitué β -Gal_{II B} (δ H-1 = 4.521 ppm) est égale à 3:7, ce ratio correspond à un transfert de Gal supérieur à 70 %. La valeur de la résonance du proton anomérique du résidu de Gal transféré δ = 4.949 ppm ($J_{1,2} \sim 3$ Hz) est caractéristique de la forme- α du Gal. La conformation- α est confirmée par la valeur des constantes de couplages vicinales $J_{H1,H2}$, $J_{H2,H3}$ et $J_{H3,H4}$. Le déplacement vers des champs plus faibles qui affect

les résonances du résidu β -Gal_{II B} H-3 ($\delta = + 0.072$ ppm) et H-4 ($\delta = + 0.125$ ppm) plaide en faveur d'une substitution O-4 de ce résidu. Cette interprétation a été confirmée lors de l'examen du spectre HMQC, qui montre clairement deux résonances du C-4 à $\delta = 70.20$ ppm (α -Gal_{III B} terminal) et $\delta = 78.47$ ppm (β -Gal_{II B} substitué sur O-4).

Tableau III. Déplacements chimiques du ^1H et du ^{13}C mesurés avec Gal β 1-3GalNAc α -1-O-bn (composé A) et Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -1-O-bn (composé B).

| unité mono-saccharidique | Déplacement chimique (ppm) | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|
| | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 | H-6' | NAc |
| Gal β 1-3 II _A | 4.454 | 3.508 | 3.620 | 3.900 | 3.75 | 3.87 | 3.82 | |
| GalNAc α 1- I _A | 4.965 | 4.293 | 4.040 | 4.256 | 4.056 | 3.74 | 3.74 | 1.964 |
| Gal α 1-4 III _B | 4.949 | 3.825 | 3.909 | 4.025 | 4.341 | 3.69 | 3.69 | |
| Gal β 1-3 II _B | 4.521 | 3.546 | 3.692 | 4.025 | 3.75 | 3.87 | 3.82 | |
| GalNAc α 1- I _B | 4.965 | 4.325 | 4.068 | 4.216 | 4.056 | 3.74 | 3.74 | 1.966 |

| unité mono-saccharidique | Déplacement chimique (ppm) | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|--|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | NAc | |
| Gal β 1-3 II _A | 106.63 | 70.33 | 72.19 | 70.17 | 76.26 | 62.7 | | |
| GalNAc α 1- I _A | 97.40 | 48.7 | 78.22 | 70.18 | 72.21 | 63.04 | 23.4 | |
| Gal α 1-4 III _B | 101.26 | 69.17 | 70.58 | 70.20 | 72.19 | 61.25 | | |
| Gal β 1-3 II _B | 106.94 | 70.60 | 73.63 | 78.47 | 76.26 | 62.7 | | |
| GalNAc α 1- I _B | 97.40 | 48.7 | 78.21 | 70.18 | 72.21 | 63.04 | 23.4 | |

Sur la base de ces observations, la structure du composé néosynthétisé a été établie : Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -1-O-bn (composé B).

Les résultats obtenus par RMN ont été confirmés par MS. Le spectre MALD-MS du produit de la réaction enzymatique après perméthylation montre uniquement deux molécules porteuses d'un ion Na^+ ou K^+ . La masse du premier ion pseudomoléculaire correspond à la masse attendue de l'accepteur perméthylé Gal β 1-3GalNAc α -1-O-bn ($[\text{M}+\text{Na}]^+ = 594.4$ m/z ou $[\text{M}+\text{K}]^+ = 610.7$ m/z / composé). La masse du second ion pseudomoléculaire correspond à

la masse théorique du composé B perméthylé ($[M+Na]^+ = 798.9$ m/z et $[M+K]^+ = 814.7$ m/z).

L'intégration des signaux permet de déterminer le rapport des intensités 20:80 entre les composés A et B. De plus, les méthyl-galactosides acétylés identifiés par GC-MS, le méthyl-2,3,6-tri-*O*-méthyl-4-mono-*O*-acétyl-galactopyrannoside et le méthyl-2,3,6-tri-*O*-méthyl-5-mono-*O*-acétyl-galactofurannoside confirment que le résidu de Gal transféré est lié par une liaison-1,4 sur le résidu Gal terminal de l'accepteur (Tableau IV)

Tableau IV. Analyse par CG-MS des oligosaccharides perméthylés, méthanolysés et peracétylés provenant du matériel obtenu après transfert de Gal sur l'accepteur Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn. composé A : Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn (accepteur); composé B : Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn (produit formé).

| Monosaccharide méthyl-éther | Ratio ^a | Origine | |
|--|--------------------|--------------------------|------------------------------|
| | | Composé A (accepteur) | Composé B (produit formé) |
| (2, 3, 4, 6)-Me ₄ -Gal ^b | 2.6 | + | + |
| (2, 3, 6)-Me ₃ -4-Ac ₁ -Gal | 1.0 | | + |
| (2, 3, 6)-Me ₃ -5-Ac ₁ -Gal ^c | 0.9 | | + |
| (4,6)-Me ₂ -GalN(Me)Ac | 1.9 | + | + |

^a (2, 3, 6)-Me₃-4-Ac₁-Gal est utilisé comme base 1,0.

^b Ac, acétyl; Me, méthyl.

^c Cette forme furannique provient de la libération par méthanolyse du (2, 3, 6)-Me₃-Gal. Il s'établit alors un équilibre entre les structures a/b pyranne et a/b furanne du (2, 3, 6)-Me₃-Gal. Après acétylation, la forme pyranne est à l'origine du (2, 3, 6)-Me₃-4-Ac₁-Gal et la forme furannique est à l'origine du (2, 3, 6)-Me₃-5-Ac₁-Gal.

4) Action de l'UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransférase sur les glycolipides et une asialo-glycoprotéine

Afin de déterminer précisément la spécificité de substrat de l'activité α 1,4-Gal-T de Mb, des incubations ont été réalisées en utilisant comme substrat

accepteur une asialo-glycoprotéine et plusieurs glycolipides. Comme indiqué dans le Tableau V, il apparaît que les glycolipides et l'asialo-glycoprotéine semblent être de pauvres substrats accepteurs pour l'activité enzymatique étudiée et ceci malgré le fait que la plus part des accepteurs choisis (asialo-fétuin, G_{A1} , G_{M1a} , et G_{D1b}) portent une ou plusieurs séquences terminales Gal β 1-3GalNAc. Comme prévu, parmi les cinq glycolipides testés le G_{M1a} et le G_{A1} sont tous deux des accepteurs de l' α 1,4-Gal-T de *Mb*. Un faible transfert a été aussi observé sur le lactosylcéramide ce qui peut être relié au transfert obtenu avec le lactose (Tableau I). Enfin, aucun transfert de Gal n'a été observé sur le GM_2 puisque la fraction glycannique de ce glycolipide porte en position terminale non réductrice un résidu de GalNAc.

Tableau V. Détermination de la spécificité de substrat de l'activité UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransférase de la lignée *Mamestra brassicae* vis-à-vis une asialo-glycoprotéine et des glycolipides utilisés comme accepteurs. Les résultats sont exprimés en valeur relative par rapport à l'incorporation de résidus de Gal sur l'accepteur Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn pris comme référence.

| Substrat ^a | [Gal β 1-3GalNAc-R] séquences terminales (mM) | Activité relative (%) |
|---------------------------------------|---|---------------------------|
| Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn | 1.0 | 100.0 (77.3) ^b |
| Asialo-fétuine ^c | 0.13 | 8.1 |
| <i>Glycolipides</i> | | |
| G_{A1} | 1.0 | 8.7 |
| G_{M1a} | 1.0 | 8.3 |
| G_{D1b} | 1.0 | 2.2 |
| Lactosylcéramide | 0.0 | 2.0 |
| GM_2 | 0.0 | 1.4 |

^a Les substrats ont été utilisés à une concentration finale de 2 mg / ml pour l'asialo-fétuine, ou 1 mM pour les glycolipides.

^b L'activité (nmol.h⁻¹.mg⁻¹) de la galactosyltransférase est indiquée entre parenthèses.

^c Dans l'essai avec asialo-fétuine la [Gal β 1-4GlcNAc-R] ~ 0.4 mM.

Il est surprenant de constater que le glycolipide G_{D1b} qui porte la séquence terminale $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ est un très mauvais substrat accepteur. Cela est probablement dû à un encombrement stérique entre l'enzyme $\alpha 1,4\text{-Gal-T}$ et les deux résidus d'acide sialique liés en $\alpha 2,8$ présents sur la fraction oligosaccharidique de ce glycolipide (Tableau I). Comme indiqué sur le Tableau V, la concentration finale utilisée lors des incubations avec les glycolipides était de 1mM, en revanche avec l'asialo-fétuine la concentration était fixée à 2 mg/ml ce qui correspond à une concentration finale de la séquence terminale $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ égale à 0,1 M. Malgré le fait que la concentration de la séquence terminale $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ était 10 fois inférieure lors des incubations réalisées avec l'asialo-glycoprotéine, le transfert obtenu avec l'asialo-fétuine est équivalent à ceux mesurés avec les glycolipides G_{M1a} et G_{A1} . Par conséquent, l'activité $\alpha 1,4\text{-Gal-T}$ de *Mb* agit préférentiellement sur le disaccharide $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ lié par une liaison *O*-glycosidique à la chaîne peptidique (aglycone), plutôt que sur ce même disaccharide porté par un glycosphingolipide.

5) *Discrimination entre le $[6\text{-}^3\text{H}]\text{-Gal}$ porté respectivement par les *O*- et les *N*-glycannes de l'asialo-fétuine après que cette asialo-glycoprotéine ait été utilisée comme accepteur*

L'asialo-fétuine (M_r : 45,500 kDa) est substituée par trois *N*-glycannes tri-antennés de type *N*-acétyllactosaminique porteurs à leurs extrémités du disaccharide $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ et trois chaînes *O*-glycanniques $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Ser/Thr}$ (Nilsson *et al.*, 1979). Par conséquent, le mélange réactionnel contenant 5 mg/ml d'asialo-fétuine permet d'atteindre une concentration en résidus de Gal en position terminale égale à environ 206 μM pour la séquence $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc-R}$ et à environ 618 μM pour la séquence $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc-R}$. Après 24 heures d'incubation à 37°C, 36,2 % des résidus terminaux de Gal ont été substitués par du $[^3\text{H}]\text{-Gal}$. Afin de discriminer entre le $[^3\text{H}]\text{-Gal}$ transféré respectivement sur les *N*- et les *O*-glycannes de l'asialo-fétuine, une β -élimination réductrice a été réalisée et les *O*-glycannes libérés ont été séparés des *N*-glycopeptides par fractionnement sur une colonne Bio-Gel P4 préalablement calibrée. Le suivi de la radioactivité à la sortie de la colonne permet d'obtenir un profil de chromatographie sur lequel on distingue deux principaux pics situés respectivement aux volumes d'élution des *N*-glycopeptides et des *O*-glycannes de l'asialo-fétuine.

Cette expérience confirme que l'activité $\alpha 1,4\text{-Gal-T}$ présente dans la fraction microsomale de *Mb* catalyse le transfert de Gal sur les asialo-

glycoprotéines possédant sur leur fractions glycaniques des résidus de Gal en position terminale. On peut constater que le transfert de [^3H]-Gal s'effectue principalement sur les O-glycannes (74,7 % de la radioactivité transférée sur l'asialo-fétuine) plutôt que sur les N-glycannes (25,3 % de la radioactivité transférée sur l'asialo-fétuine). De plus, ce résultat montre que 65,5 % des séquences terminales Gal β 1-3GalNAc ont été substituées par un résidu de Gal, alors que seulement 7,9 % des séquences Gal β 1-4GlcNAc ont été substituées.

6) Immunoréactivité du produit formé Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -O-bn

Les hématies du groupe P sont classées en cinq phénotypes P_1 , P_2 , P_1^k , P_2^k et p, en fonction de la présence ou de l'absence à leur surface de trois antigènes: l'antigène P (GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer), l'antigène P^k (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) et l'antigène P_1 (Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer). Les hématies P_1 expriment les antigènes P et P_1 ; les hématies P_1^k expriment les antigènes P^k et P_1 ; les hématies P_2^k expriment uniquement l'antigène P^k ; alors que les hématies p n'expriment aucun antigènes du groupe P (les érythrocytes p seront utilisés comme témoin négatifs). Au cours de cette étude, la concentration minimale de l'aryl-glycoside Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn, qui entraîne une inhibition de l'héماغglutination des érythrocytes du groupe P, a été déterminé, et ceci pour chaque couple érythrocyte-anticorps capable d'interagir (Tableau VI). Ces mêmes expériences ont été réalisées avec l'aryl-glycoside Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn et dans ce cas aucun phénomène d'inhibition n'a été observé. L'aryl-glycoside Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn (concentration minimale 0,4 mM) s'est avéré capable d'inhiber l'agglutination des cellules P_1^k et P_2^k (qui expriment l'antigène P^k) causée par l'anticorps monoclonal anti- P^k . Cependant, les agglutinations des érythrocytes P_1 causées par les anticorps anti-P ou anti- P_1 ne sont pas inhibées par le produit formé Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn. Signalons, que l'aryl-glycoside Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn (concentration minimale 0,08 mM) est capable d'inhiber les héماغglutinations induites par la BSI-B $_4$.

Tableau VI. Inhibition de l'agglutination des hématies humaines du groupe P par l'aryl-glycoside $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha\text{-O-bn}$. Concentration minimale de l'aryl-glycoside entraînant l'inhibition de l'agglutination des hématies humaines papainées induite par des anticorps monoclonaux ou la BSI-B₄.

| Anticorps monoclonal ou Lectine | érythrocytes humains du groupe P | | |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | P ₁ | P ^k ₁ | P ^k ₂ |
| Anti-P ₁ | nt ^a | > 6.5 | nt |
| Anti-P ^k | nt | 0.4 | 0.4 |
| Anti-P | > 6.5 | nt | nt |
| BSI-B ₄ | 0.08 | 0.08 | nt |

^a nt: non testé.

III) Conclusion

Ce travail démontre pour la première fois la présence d'une activité UDP-Gal : $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1,4\text{-galactosyltransférase}$ dans la lignée cellulaire de lépidoptère *Mb*. De plus, plusieurs approches ont été mises en œuvre afin de démontrer l'existence de cette activité glycosyltransférase originale.

Après séparation par SDS-PAGE des protéines présentes dans les homogénats cellulaires des lignées d'insectes *Sf-9*, *Mb* et *Tn*, on observe par Western blot que la lectine BSI-B₄ reconnaît spécifiquement des glycoprotéines endogènes au sein des trois lignées cellulaires de lépidoptères. Bien que le profil de fixation de la BSI-B₄ soit spécifique pour chaque lignée, dans les trois clones cellulaires les glycoprotéines révélées ont un poids moléculaire apparent élevé majoritairement compris entre 90 et 120 kDa. La plus intense révélation est observée pour une bande de 100-110 kDa dans la lignée *Mb*. La spécificité de liaison de la BSI-B₄ étant connue (Hayes *et al.*, 1974; Murphy *et al.*, 1977; Wu *et al.*, 1995), ces résultats montrent que les trois lignées de lépidoptères étudiée possèdent des glycoprotéines endogènes substituées par des oligosaccharides porteurs à leurs extrémité non réductrice de la séquence $\text{Gal}\alpha 1-3/4\text{Gal}$.

Cette première observation a été le prétexte à la recherche d'une activité $\alpha\text{-galactosyltransférase}$ dans la lignée *Mb*. Afin de mettre en évidence l'activité glycosyltransférase responsable chez *Mb* de la biosynthèse de

séquence terminale α -Gal, nous avons incubé la fraction microsomaie de *Mb* avec de l'UDP-Gal et différents substrats accepteurs qui possédaient tous un résidu de Gal en position terminale non réductrice. Le choix des substrats accepteurs a été réalisé en fonction de la spécificité de la BSI-B4 et en fonction de la spécificité de substrat des différentes α -galactosyltransférases caractérisées à ce jour qui catalysent toutes le transfert d'un résidu de Gal pour aboutir au disaccharide terminal Gal α 1-3Gal (Blanken and Van den Eijnden, 1985; Joziassse *et al.*, 1989; Joziassse *et al.*, 1992) ou Gal α 1-4Gal (Taniguchi *et al.*, 1985; Bailly *et al.*, 1992; Stults *et al.*, 1995). Les différents substrats oligosaccharidiques, ont permis de mettre en évidence que l' α -galactosyltransférase de *Mb* agit préférentiellement sur des accepteurs de type Gal β 1-3-R (Table I) et parmi tous les glycanes accepteur, la mesure de l'activité de substrat relative V_{Max} / K_M prouve que le disaccharide Gal β 1-3GalNAc est le meilleur accepteur (Tableau II).

Afin de déterminer la liaison (anométrie et substitution) entre le résidu de Gal transféré et l'accepteur, nous avons préparé une importante quantité du produit galactosylé en utilisant comme accepteur l'aryl-glycoside Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn et comme source d'enzyme la fraction microsomale de *Mb*. L'analyse par RMN et MS du produit formé a permis d'établir que l'activité α -galactosyltransférase de *Mb* synthétise le produit : Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn. Il est remarquable qu'un seul produit galactosylé a été identifié sans qu'aucun signal correspondant à une nouvelle liaison β ou à des substitutions autres que celle du C-4 du Gal accepteur n'ait pu être mise en évidence au cours des analyses par RMN ou MS. On peut donc conclure que les microsomes de *Mb* renferment essentiellement ou exclusivement une activité α -galactosyltransférase qui catalyse l'ajout de résidus de Gal par une liaison α 1,4 sur les séquences terminales Gal β 1-3GalNAc.

Le disaccharide terminal Gal β 1-3GalNAc est habituellement retrouvé sur les sites de O-glycosylation de nombreuses asialo-glycoprotéines, ainsi que sur des glycolipides tels que le G_{A1}, le G_{M1a} ou le G_{D1b}. Il est démontré que l' α 1,4-Gal-T de *Mb* agit préférentiellement sur les glycoprotéines plutôt que sur les glycolipides. Ce résultat est en accord avec l'observation concernant la fixation de la BSI-B4 sur les glycoprotéines endogènes de la lignée *Mb*. Par la suite, il a été démontré que cette nouvelle activité catalyse préférentiellement le transfert de résidus de Gal sur les O-glycanes Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr plutôt que sur les disaccharides Gal β 1-4GlcNAc présents en position terminale non réductrice des N-glycanes de l'asialo-fétuine.

La source d'enzyme utilisée étant la fraction microsomale de la lignée *Mb*, on ne peut pas exclure la présence d'autres galactosyltransférases utilisant l'UDP-Gal comme substrat donneur. Toutefois, seule l'activité core-1 β 1,3-galactosyltransférase (UDP-Gal : GalNAc α 1-O-Ser/Thr β 1,3-galactosyltransférase) a été caractérisée dans les lignées cellulaires de lépidoptères (Thomsen *et al.*, 1990) et l'activité β 1,4-galactosyltransférase (UDP-Gal : GlcNAc β 1,4-galactosyltransférase) qui catalyse l'addition de Gal sur les structures *N*-glycanniques n'a jamais été mise en évidence dans les cellules d'insectes. De plus, ces deux enzymes n'utilisent pas comme substrat accepteur des oligosaccharides porteur à leur extrémité non réductrice d'un résidu de Gal. Par conséquent, il est peut probable que des galactosyltransférases ait pu interférer dans les essais visant à caractériser α -galactosyltransférase de *Mb* et ceci malgré la présence dans les microsomes de *Mb* de nombreuses glycosyltransférases.

Le disaccharide Gal α 1-4Gal a été recherché dans différents tissus animaux et humains (Taniguchi *et al.*, 1985; Bailly *et al.*, 1992; Stults *et al.*, 1995). Ces études ont montré que seuls des glycolipides étaient porteurs du disaccharide Gal α 1-4Gal tels que, le galabiosylcéramide (Gal α 1-4Gal β 1-Cer) ou les antigènes du groupe sanguin P (Yang *et al.*, 1994). Le groupe sanguin P est constitué de trois antigènes qui possèdent le disaccharide Gal α 1-4Gal : l'antigène P^k (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) ; l'antigène P (GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) et l'antigène P₁ (Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer) (Bailly *et al.*, 1992). L'activité α 1,4-Gal-T caractérisée dans la lignée *Mb* est original car elle catalyse la synthèse de l'épitope Gal α 1-4Gal lié en β 1,3 sur un résidu de GalNAc et agit préférentiellement sur les glycoprotéines plutôt que sur les glycolipides.

L'importante activité α 1,4-Gal-T présente dans *Mb* a permis de synthétiser plusieurs milligrammes de l'aryl-glycoside Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn et ainsi d'initier des expériences visant à trouver des applications au trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc. De plus, cet aryl-glycoside s'est avéré capable d'inhiber l'agglutination des hématies P^k₁ et P^k₂ causée par les anticorps anti-P^k, spécifiques du glycosylcéramide Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer. Comme l'agglutination des érythrocytes P₁ par l'anticorps anti-P₁, spécifique du glycosylcéramide Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer, n'est pas inhibée par ce nouvel aryl-glycoside, on peut en conclure qu'il existe une inhibition spécifique de l'antigène P^k, mais pas de réaction croisée avec l'antigène P₁. Ces résultats confirment des observations antérieures qui indiquent que les anticorps anti-P^k ont une spécificité relativement large vis-à-vis

du disaccharide Gal α 1-4Gal, alors que la spécificité des anticorps anti-P₁ est plus stricte et met en évidence le rôle critique de la N-acétylglucosamine dans le trisaccharide terminal du glycosylcéramide P₁ (Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer) (Watkins et Morgan, 1976 ; Cowles et Blumberg, 1986 ;
5 Bailly *et al.*, 1987). De plus, l'aryl-glycoside Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -O-bn est capable d'inhiber les agglutinations des hématies P₁ et P₁^k provoquées par la BSI-B₄ (Tableau VI). Cette dernière information est à rapprocher de l'observation princeps, c'est à dire la fixation spécifique de la BSI-B₄ sur les glycoprotéines endogènes de la lignée Mb, et plaide en faveur de la présence du
10 trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc sur les glycoprotéines endogènes de la lignée Mb.

Il faut signaler que de nombreuses études ont montré que le galabiosylcéramide, ainsi que les antigènes P₁ et P^k étaient présents sur les tissus humains et animaux (particulièrement chez le porc) (Holgersson *et al.*, 1990 ;
15 Lundblad *et al.*, 1980 ; Bock *et al.*, 1985 ; Lanne *et al.*, 1996). De plus, le disaccharide Gal α 1-4Gal présent sur les glycolipides est responsable de la fixation de bactéries pathogènes, de toxines bactériennes et de virus à la surface de tissus humains et animaux. Le trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc, libre ou conjugué, peut inhiber l'adhésion sur les tissus hôtes des bactéries pathogènes, telles que : les souches d'*Escherichia coli* uréopathogènes (Bock *et al.*, 1985) ; les souches d'*Escherichia coli* exprimant les G-adhésines (Pap G) sur leurs P-fimbriae (Strömberg *et al.*, 1990) et les souches de *Streptococcus suis* qui sont responsables de méningites chez le porc et l'homme (Haataja *et al.*, 1993 et 1994). Le trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc peut aussi empêcher
25 l'adhésion de toxines bactériennes, telles que : la Vero toxine d'*Escherichia coli* qui peut contaminer les viandes bovines et ovines et provoquer des diarrhées hémorragiques et des insuffisances rénales aiguës chez les consommateurs (Lingwood *et al.*, 1987 ; Yiu et Lingwood, 1992) ; la Shiga toxine de *Shigella dysenteriae* (Lindberg *et al.*, 1987) ; l'enterotoxine-B de *Staphylococcus* qui est responsable de diarrhées potentiellement létales pour l'homme (Chatterjee *et al.*,
30 1995). De plus, l'activité α 1,4-GT de Mb peut être utilisée pour la synthèse d'oligosaccharides renfermant le disaccharide Gal α 1-4Gal. Ainsi, des glycannes porteurs d'une antigénicité de type P peuvent être utilisés pour lutter contre les infections provoquées par le Parvovirus B19 puisque celui-ci reconnaît l'antigène P. Ce virus est responsable d'anémies chez l'homme qui peuvent
35 entraîner la mort de fœtus (Brown *et al.*, 1993).

En conclusion, cette étude a permis d'identifier et de caractériser une nouvelle activité α 1,4-Gal-T dans la lignée Mb responsable de la présence de

l'épitope disaccharidique Gal α 1-4Gal sur les *O*-glycoprotéines endogènes de *Mb*. Cette nouvelle glycosyltransférase caractérisée chez les insectes représentent une source d'enzyme pour la biosynthèse d'épitopes oligosaccharidiques utilisables en thérapie.

Références

- Altmann, F. and März, L. (1995) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells: evidence for α -mannosidase II. *Glycoconjugate J.*, **12**, 150-155.
- 5 Bailly, P., Chevaleyre, J., Sondag, D., François-Gérard, C., Piquet, Y., Vezon, G. and Cartron, J.P. (1987) characterization of a murine monoclonal antibody specific for the human P₁ blood group antigen. *Mol. Immunol.*, **24**, 171-176.
- 10 Bailly, P., Piller, F., Gillard, B., Veyrières, A., Marcus, D. and Cartron, J.P. (1992) Biosynthesis of the blood group P^k and P₁ antigens by human kidney microsomes. *Carbohydr. Res.*, **228**, 277-287.
- 15 Blanken, W.M. and Van den Eijnden, D.H. (1985) Biosynthesis of terminal Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-*R* oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal : *N*-acetyllactosaminide α 1,3-galactosyltransferase from calf thymus. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12927-12934.
- 20 Bock, K., Breimer, M.E., Brignole, A., Hansson, G.C., Karlsson, K.-A., Larson, G., Leffler, H., Samuelsson, B.E., Strömberg, N., Edén, C.S. and Thurin, J. (1985) Specificity of binding of the strain of uropathogenic *Escherichia coli* to Gal α 1-4Gal-containing glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.*, **260**, 8545-8551.
- 25 Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Boshell, M., Gendler, S. and Duhig, T. (1989) A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int. J. Cancer*, **44**, 691-696.
- 30 Butters, T.D. and Hughes, R.C. (1981) Isolation and characterization of mosquito cell membrane glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 655-671.
- Castronovo, V., Foidart, J.M., Li Vecchi, Foidart, J.B., Bracke, M., Mareel, M. and Mahieu, P. (1987) Human anti-galactosyl IgG reduces the lung colonization by murin MO4 cells. *Invasion Metastasis* **7**, 325-345.
- Chatterjee, S., Klullar, M. and Shi, W.Y. (1995) Digalactosylceramide is the receptor for staphylococcal enterotoxin-B in human kidney proximal tubular cells. *Glycobiology*, **5**, 327-333.
- Chen, W., Shen, Q. and Bahl, O.P. (1991) Carbohydrate variant of the recombinant β -subunit of human choriogonadotropin expressed in baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4081-4087.
- 35 Ciucanu, I. and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrate. *Carbohydr. Res.*, **131**, 209-217.
- Cowles, J.W. and Blumberg, N. (1986) Neutralization of P blood group antibodies by synthetic solid-phase antigens. *Transfusion*, **27**, 272-275.

Davidson, D.J., Fraser, M.J. and Castellino, F.J. (1990) Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells. *Biochemistry*, **29**, 5584-5590.

5 Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991a) Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line (IZD-MBO503) *Biochemistry*, **30**, 6689-6696.

Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991b) Asparagine-linked oligosaccharide processing in lepidopteran insect cells. Temporal dependence of the nature of the oligosaccharides assembled on asparagine-289 of recombinant human plasminogen produced in baculovirus vector infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf-21AE) cells. *Biochemistry*, **30**, 6167-6174

10 Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. (1981) Gas-Liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem.*, **116**, 489-502.

Galili, U., Buehler, J., Shohet, S.B. and Macher, B.A. (1987) The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J. Exp. Med.*, **165**, 693-704.

20 Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J. and Shohet, S.B. (1985) Human natural anti- α -galactosyl IgG. II. The specific recognition of $\alpha(1-3)$ -linked galactose residues. *J. Exp. Med.*, **162**, 573-582.

Galili, U., Rachmilewitz, E. A., Peleg, A. and Flechner, I. (1984) A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J. Exp. Med.*, **160**, 1519-1531.

25 Galili, U., Shohet, S.B., Kobrin, E., Stults, C.L.M. and Macher, B.A. (1988) Man, apes, and old world monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cell. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17755-17762.

30 Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimtz, M., Jäger, V. and Conradt, H.S. (1993) Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus -infected Sf-21 cells. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 189-197.

Haataja, S., Tikkanen, K., Luikkonen, J. François-Gérard, C. and Finne, J. (1993) Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4311-4317.

35 Haataja, S., Tikkanen, K., Nilsson, U., Magnusson, G., Karlsson, K.A. and Finne, J. (1994) Oligosaccharide-receptor interaction of the Gal α 1-4Gal binding adhesin of *Streptococcus suis*. *J. Biol. Chem.* **269**, 27466-27472.

- Hard, K., Van Doorn, J.M., Thomas-Oates, J.E., Kamerling, J.P. and Van Der Horst, D.J. (1993) Structure of the Asn-linked oligosaccharides of apolipoprotein III from the insect *Locusta migratoria*. Carbohydrate-linked 2-Aminocethylphosphonate as a constituent of a glycoprotein. *Biochemistry*, **32**, 766-775.
- Hayes, C.E. and Goldstein, I.J. (1974) An alpha-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1904-1914.
- Holgersson, J., Jovall, P.A., Samuelsson, B.E. and Breimer, M.E. (1990) Structural characterization of non-acid glycosphingolipids in kidneys of single blood group O and A pigs. *J. Biochem.*, **108**, 766-777.
- Hsieh, P. and Robbins, P.W. (1984) Regulation of asparagine-linked oligosaccharide processing: Oligosaccharide processing in *Aedes albopictus* mosquito cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2375-2382.
- Jarvis, D.L. and Summers, M.D. (1989) Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 214-223.
- Jenkins, N., Parekh, R.B. and James D.C. (1996) Getting the glycosylation right: implication for the biotechnology industry. *Nature Biotechnol.*, 975-981
- Jerome, K.R., Barnd, D.L., Bendt, K.M., Boyer, C.M., Taylor-Papadimitriou, J., McKenzie, I.F.C.Jr and Finn, O.J. (1991) Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.*, **51**, 2908-2916.
- Joziasse, D.H., Shaper, J.H., Van den Eijnden, D.H., Van Tunen, A.J. and Shaper, N.L. (1989) Bovine α 1,3-galactosyltransferase : isolation and characterization of a cDNA clone. Identification of homologous sequences in human genomic DNA. *J. Biol. Chem.*, **264**, 14290-14297.
- Joziasse, D.H., Shaper, N.L., Kim, D., Van den Eijnden, D.H., and Shaper, J.H. (1992) α 1,3-galactosyltransferase. A single gene locus specifies four isoforms of the enzyme by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5534-5541.
- Kang, C.Y. (1988) Baculovirus vectors for expression of foreign genes. *Adv. Virus Res.*, **35**, 177-192.
- Klenk, H.-D. (1990) Influence of glycosylation on antigenicity of viral proteins, In: van Regenmortel, M.H.V and Neurath, A.R. (eds), *Immunochemistry of Viruses, II. The Basis of Serodiagnosis and Vaccines*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 25-37.

- Kotera, Y., Fontenot, J., Pecher, G., Metzgar, R. S. and Finn, O. J. (1994) Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res.*, **54**, 2856-2860.
- 5 Kubelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., Tretter, V., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F.G. (1993) Primary structure of the *N*-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A₂. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1193-1204.
- 10 Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G. and März, L. (1994) Structures of the *N*-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (Sf-21, IZD-Mb-0503, Bm-N). *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 148-157.
- 15 Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Klenk, H.-D. and Doerfler, W. (1986) Expression of the influenza virus hemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector. *EMBO J.*, **5**, 1359-1365.
- Kuroda, K., Gröner, A., Frese, K., Drenckhahn, D., Hauser, C., Rott, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1989) Synthesis of biologically active influenza virus hemagglutinin in insect larvae. *J. Virol.*, **63**, 1677-1685
- 20 Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1990) The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector *Virology*, **174**, 418-429.
- Kuroda, K., Veit, M. and Klenk, H.-D. (1991) Retarded processing of influenza virus hemagglutinin in insect cells. *Virology*, **180**, 159-165.
- 25 Laemmly, (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-681.
- Lanne, B., Jondal, M. and Karlsson, K.A. (1996) Gal α 1-4Gal-binding antibodies: specificity and use for the mapping of glycolipids of burkitt lymphoma and other human tumors. *Glycobiology*, **6**, 423-431.
- 30 Lindberg, A.A., Brown, J.E., Strömberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J. E. and Karlsson, K. A. (1987) Identification of a carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type1. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1779-1785.
- Lingwood, C. A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S. and Karmali, M. (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.*, **262**, 8834-8839.
- 35 Lopez, M., Coddeville, B., Langridge, J., Plancke, Y., Sautiere, P., Chabihi, H., Chirat, F., Harduin-Lepers, A., Cerutti, M., Verbert, A. and Delannoy, P. (1997) Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant

bovine lactoferrin expressed in *Mamestra brassicae* cells. *Glycobiology*, 7, in press.

Luckow, V.A and Summers. M.D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, 6, 47-55.

5 Lundblad, A., Svensson, S., Löw, B., Messeter, L. and Cedergren, B. (1980) Release of oligosaccharides from human erythrocyte membranes of different blood group-P phenotypes by trifluoroacetolysis. *Eur. J. Biochem.*, 104, 323-330.

10 Manneberg, M., Friedlein, A., Kurth, H., Lahm, H.-W. and Fountoulakis M. (1994) Structural analysis and localization of the carbohydrate moieties of the soluble human interferon receptor produced in baculovirus-infected insect cells. *Protein Science*, 3, 30-38.

Miller, L.K. (1988) Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.*, 42, 177-199.

15 Munk, K., Pritzer, E., Kretzschmar, E., Gutte, B., Garten, W. and Klenk, H.-D. (1992) Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus hemagglutinin independent of oligosaccharide size. *Glycobiology*, 2, 233-240.

Murphy, L.A. and Goldstein, I.J. (1977) Five α -D-galactopyranosyl-binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J. Biol. Chem.*, 252, 4739-4742.

20 Nilsson, B., Norden, N.E. and Svensson, S (1979) Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. *J. Biol. Chem.*, 254, 4545-4553.

25 Noteborn, M.H.M., Kant, A., Eijdens, E.W.H.M., De Boer, GF, Van Der Eb, A.J. and Koch, G. (1992) Immunogenic properties of avian leukosis virus env-proteins synthesized with a baculovirus expression vector. In Vlak, J.M., Schlaeger, E.-J. and Bernard, A.R. (eds), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes* Editiones Roche, Basel, Switzerland, 92-97.

Ogonah, W.O., Freedman, R.B., Jenkins, N., Patel, K. and Rooney, B.C. (1996) Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex N-linked glycosylation on recombinant proteins. *Bio/Technology*, 14, 197-202.

30 O'Reilly, D.R., Miller, L.K. and Luckow, V.A. (1994) Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. Oxford University Press, New York.

35 Paulson, J.C., Prieels, J.P., Glasgow, L. R. and Hill, R.L. (1978) Sialyl- and fucosyltransferases in the biosynthesis of asparaginyl-linked oligosaccharides in glycoproteins. Mutually exclusive glycosylation by β -galactoside α 2 goes to 6 sialyltransferase and N-acetylglucosaminide α 1 goes to 3 fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 253, 5617-5624.

Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83, 346-356.

- Ponimaskin, E., Veit, M. and Schmidt, M.F.G. (1994) Expression of the Sendai virus fusion protein in insect cells and characterization of its posttranslational modifications. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1163-1167.
- 5 Rother, R. P. and Squinno, P.S. (1996) The α -galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. *Cell*, **86**, 185-188.
- Spiro, R.G. and Bhoyroo, V.D. (1974) Structure of the *O*-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 5703-5717.
- 10 Staudacher, E., Altmann, F., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1992a) α 1-6(α 1-3)-Difucosylation of the asparagine-bound *N*-acetylglucosamine in honeybee venom phospholipase A₂. *Glycoconjugate J.*, **9**, 82-85
- Staudacher, E., Kubelka, V. and März, L. (1992b) Distinct *N*-glycan fucosylation potentials of three lepidopteran cell lines. *Eur. J. Biochem.*, **207**, 987-993
- 15 Stults, C.L.M., Larsen, R.D. and Macher, B.A. (1995) α 1,4galactosyltransferase activity and Gb₃Cer expression in human leukemia / lymphoma cell lines. *Glycoconjugate J.*, **12**, 680-689.
- Takeuchi, M. and Kobata, A. (1991) Structures and function roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology*, **349**, 196-197.
- 20 Taniguchi, N., Yanagisawa, K., Makita, A. and Naiki, M. (1985) Purification and properties of rat liver globotriaosylceramide synthase, UDP-galactose : lactosylceramide α 1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 4908-4913.
- Tetaert, D., Soudan, B., Lo-Guidice, J. M., Richet, C., Degand, P., Boussard, G., Mariller, C. and Spik, G. (1994) Combination of high-performance anion-exchange chromatography and electrospray mass spectrometry for analysis of the in vitro *O*-glycosylated mucin motif peptide. *J. Chromatogr.*, **658**, 31-38.
- 25 Thomsen, D.R., Post, L.E. and Elhammer, A.P. (1990) Structure of *O*-glycosidically linked oligosaccharides synthesized by the insect cell line Sf9. *J. Cell. Biochem.*, **43**, 67-79.
- 30 Thotakura, N.R. and Blithe, D.L. (1995) Glycoprotein hormones: glycobiology of gonadotrophins, thyrotrophin and free α subunit. *Glycobiology*, **5**, 3-10.
- Towbin, H., Rosenfelder, G., Wieslander, J., Avila, J.L., Rojas, M., Szarfman, A., Esser, K., Nowack, H. and Timpl, R. (1987) Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.*, **166**, 419-432.
- 35

Vaessen, R.T., Kreike, J. and Groot, G.S.P. (1981) Protein transfer to nitrocellulose filters. *FEBS Lett.* **124**, 193-196.

Vandamme, V., Cazlaris, H., Le Marer, N., Laudet, V., Lagrou, C., Verbert, A. and Delannoy, P. (1992) Comparison of sialyl- and α 1,3-galactosyltransferase activity in NIH3T3 transformed with the *ras* oncogene : increased β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. *Biochimie*, **74**, 89-100.

Van Die, I., Van Tetering, A., Bakker, H., Van den Eijnden, D.H. and Joziassse, D.H (1996) Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a β 1-4-*N*-acetylgalactosyl-transferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology*, **6**, 157-164

Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. and McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera; Noctuidae). *In vitro*, **13**, 213-217.

Veit, M., Scott, C., Borchers, K., Ludwig, H. and Schmidt, M.F.G. (1993) Structure, function, and intracellular localization of glycoprotein B of herpes virus simian agent 8 expressed in insect and mammalian cells. *Arch Virol.*, **133**, 335-347.

Velardo, M.A., Bretthauer, R.K., Boutaud, A., Reinhold, B., Reinhold, V.N. and Castellino, F.J (1993) The presence of UDP-*N*-acetylglucosamine: α -3-D-mannoside β 1,2-*N*-acetyl-glucosaminyltransferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-Sf-21AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17902-17907.

Voss, T., Veit, M., Scott, C., Borchers, K., Ludwig, H. and Schmidt, M.F.G. (1993) Structure, function, and intracellular localization of glycoprotein B of herpes virus simian agent 8 expressed in insect and mammalian cells. *Arch Virol.*, **133**, 335-347.

Watkins, W.N. and Morgan, W.T.J. (1976) Immunochemical observations on the human blood group P system. *J. Immunogenet.*, **3**, 15-27.

Wathen, M.W., Aeed, P.A. and Elhammer, A.P. (1991) Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line Sf-9. *Biochemistry*, **30**, 2863-2868.

Williams, P.J., Wormald, M.R., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Parker, G.F. and Roberts, D.R. (1991) Characterization of oligosaccharides from *Drosophila melanogaster* glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1075**, 146-153.

Wright, A. and Morrison, S.L. (1994) Effect of altered C_H2-associate carbohydrate structure on the functional properties and *in vivo* fate of chimeric mouse-human immunoglobulin G1. *J. Exp. Med.*, **180**, 1087-1096.

Wu, M., Song, S.C., Wu J.H. and Kabat E.A. (1995) Affinity of *Bandeiraea (Criffonia) simplicifolia* lectin-I, isolectin B4 for Gal α 1-4Gal ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 814-820.

Yang, Z., Bergström, J. and Karlsson, K.A. (1994) Glycoproteins with Gal α Gal are absent from human erythrocyte membranes, indicating that glycolipids are the sole carries of blood group P activities. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14620-14624.

Yeh, J., Seals, J.R., Murphy, C.I., van Halbeek, H. and Cummings, R.D. (1993) Site-specific N-glycosylation and oligosaccharide structures of recombinant HIV-1 gp120 derived from a baculovirus expression system. *Biochemistry*, **32**, 11087-11099.

Yiu, S.C.K. and Lingwood, C.A. (1992) Polyisobutylmethacrylate modifies glycolipid binding specificity of verotoxin 1 in thin-layer chromatogram overlay procedures. *Anal. Biochem.*, **202**, 188-192.

Abbreviations

Ac, acétyl; α 1,4-Gal-T, UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransférase; α Me-Gal, Gal α 1-O-méthyl; bn, benzyl; BSI-B₄, *Bandeiraea simplicifolia* lectine-I isolectine B₄; Cer, céramide; COSY, *two-dimensional homonuclear correlation spectroscopy*; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride; Fuc, fucose; Gal, galactose; GalNAc, N-acétylgalactosamine; GC, chromatographie en phase gazeuse, GC-MS, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse; Glc, glucose; GlcNAc, N-acétylglucosamine; HMQC, *two-dimensional heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy*; Me, méthyl; MALD-MS, *matrix-assisted laser desorption mass spectrometry*; Man, mannose; Mb, lignée *Mamestra brassicae* clone SPCMb-92-C6; Me, méthyl; MES, acide 4-morpholine-éthanesulfonique; MS, Spectrométrie de masse; RMN, résonance magnétique nucléaire; PBS, Tampon de phosphate de sodium; pNp, p-nitrophénol; Sf-9, lignée *Spodoptera frugiperda* clone ATCC CRL 1711; Sf-21, Lignée non clonée *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21-AE; TBS, Tris/HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, pH7.4; Tn, lignée *Trichoplusia ni* clone Tn-5-B14.

REVENDICATIONS

5 1. Utilisation d'enzymes à activité α -galactosyltransférase provenant de cellules d'insectes, pour la mise en oeuvre d'un procédé enzymatique de préparation de composés α -galactosylés, ledit procédé comprenant une étape de transfert d'un résidu de galactose sur un résidu terminal de galactose d'un substrat déterminé.

10 2. Utilisation selon la revendication 1, d'enzymes à activité α 1,4-galactosyltransférase, pour la mise en oeuvre d'un procédé de préparation de composés α 1,4-galactosylés, ledit procédé comprenant une étape de transfert d'un résidu de galactose, par l'intermédiaire d'une liaison- α 1,4, sur un résidu terminal de galactose d'un substrat déterminé, de manière à obtenir un produit comportant un disaccharide Gal α 1-4Gal, en position terminale non réductrice.

15 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les cellules d'insectes sont des cellules de lépidoptères, notamment des espèces :

- *Spodoptera*, tel que *Spodoptera frugiperda*,
- *Mamestra*, tel que *Mamestra brassicae*,
- 20 - *Trichoplusia*, tel que *Trichoplusia ni*.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les cellules d'insectes sont des cellules de *Mamestra*, tel que *Mamestra brassicae*, notamment des cellules de la lignée cellulaire de *Mamestra brassicae* déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2045, le 26 juin 1998.

5. Cellules de la lignée cellulaire de *Mamestra brassicae* déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2045, le 26 juin 1998.

35 6. Extrait cellulaire à activité α -galactosyltransférase, notamment α 1,4-galactosyltransférase, tel qu'obtenu à partir de cellules d'insectes, notamment à partir de cellules de lépidoptères telles que définies dans la revendication 3 ou 4.

7. Procédé enzymatique de préparation de composés α -galactosylés, comprenant une étape de transfert d'un résidu de galactose sur un résidu

terminal de galactose d'un substrat déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la réaction d'UDP-Gal avec ledit substrat en présence d'une enzyme à activité α -galactosyltransférase telle qu'obtenue à partir de cellules d'insectes, telles que celles définies dans la revendication 3 ou 4,
- le cas échéant la purification du produit obtenu lors de la réaction précédente.

8. Procédé enzymatique selon la revendication 7, caractérisé en ce que la réaction d'UDP-Gal avec le substrat est effectuée en présence de cellules d'insectes exprimant l'enzyme à activité α -galactosyltransférase nécessaire à ladite réaction, ou en présence d'un extrait cellulaire selon la revendication 6.

9. Procédé de préparation de α 1,4-galactosylés, par transfert d'un résidu de galactose, par l'intermédiaire d'une liaison α 1,4, sur un résidu terminal de galactose d'un substrat déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

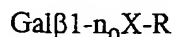
- la réaction d'UDP-Gal avec ledit substrat en présence d'une enzyme à activité α 1,4-galactosyltransférase telle qu'obtenue à partir de cellules d'insectes, pour obtenir un composé α 1,4-galactosylé, comprenant le disaccharide Gal α 1-4Gal en position terminale non réductrice,
- le cas échéant la purification dudit produit ainsi obtenu.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la réaction d'UDP-Gal avec le substrat est effectuée en présence de cellules d'insectes, telles que celles définies dans la revendication 3 ou 4, productrices de l'enzyme à activité α 1,4-galactosyltransférase nécessaire à ladite réaction, ou en présence d'un extrait cellulaire selon la revendication 6.

11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que les cellules d'insectes utilisées sont des cellules de *Mamestra*, tel que *Mamestra brassicae*, et plus particulièrement des cellules de la lignée cellulaire de *Mamestra brassicae* déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2045, le 26 juin 1998.

12. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que :

* le substrat est un composé de formule :



dans laquelle :

- n_0 correspond à la position, sur le résidu X défini ci-après, du carbone porteur de l'hydroxyle sur lequel s'effectue la liaison avec le résidu terminal de β -D-galactopyranose dudit substrat (représenté par Gal β 1 dans la formule ci-dessus), et représente 1, 2, 3, 4, ou 6; de préférence n_0 représente 3 ou 4, et

- X représente un oside, notamment un résidu de galactose, ou de glucose, ou de N-acétyl-D-galactosamine ou de 2-O-acétyl-D-galactopyranose,

- R représente :

. un atome d'hydrogène,

. un monosaccharide ou un oligosaccharide,

. un oside ou oligoside porteur à leur extrémité réductrice d'un aglycone tel que défini ci-dessous,

. un aglycone, tel qu'un groupe benzyle ou phényle, substitué ou non, notamment un groupe paranitrophényle, ou un groupe alkyle de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe $-(CH_2)_m-CH_3$ dans lequel m représente 0 ou un nombre entier de 1 à 7,

. une glycoprotéine, notamment une glycoprotéine substituée par des O-glycannes, telle que l'asialo-fétuine,

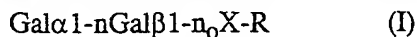
. un acide aminé, un peptide, une protéine, ou une néoglycoprotéine, notamment l'albumine sérique bovine chimiquement couplée à un oligoside,

. un glycolipide, notamment le lactosylcéramide de formule Gal β 1-4Glc β 1-Cer, le G_{M3} de formule NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer, le G_{D3} de formule NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer,

. un lipide, un céramide,

. un support multivalent non immunogène, notamment un dérivé de polyacrylamide, ou une polylysine, dont les fonctions amines des chaînes latérales sont substituées par des groupes de formule Gal β 1- n_0 X- dans laquelle n_0 et X sont tels que définis ci-dessus,

* le produit obtenu est un composé de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- n_0 X et R sont tels que définis ci-dessus, et n correspond à la position de l'atome de carbone, du résidu de galactose terminal dudit substrat, porteur de l'hydroxyle sur lequel s'effectue la liaison avec le résidu de galactose transféré.

13. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que le substrat est choisi parmi les composés suivants :



Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn,
 Gal β 1-3(2-O-Ac)Gal β 1-O-Me,
 Gal β 1-3GlcNAc β 1-O-octyl,
 Gal β 1-3GlcNAc,
 5 Gal β 1-4Glc,
 Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,
 Gal β 1-4GlcNAc,
 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,
 Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer,
 10 Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-Cer,
 Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-Cer,
 Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr.

14. Composés de formule (I) suivante :

15 Gal α 1-nGal β 1-n₀X-R (I)

dans laquelle :

- n₀ correspond à la position, sur le résidu X défini ci-après, du carbone porteur de l'hydroxyle sur lequel s'effectue la liaison avec le résidu terminal de β -D-galactopyranose dudit substrat (représenté par Gal β 1 dans la formule ci-dessus), et représente 1, 2, 3, 4, ou 6; de préférence n₀ représente 3 ou 4, et
- n représente 4,
- X représente un oside, notamment un résidu de galactose, ou de glucose, ou de N-acétyl-D-galactosamine ou de 2-O-acétyl-D-galactopyranose,
- R représente :
 - 25 . un atome d'hydrogène,
 - . un monosaccharide ou un oligosaccharide,
 - . un oside ou oligoside porteur à leur extrémité réductrice d'un aglycone tel que défini ci-dessous,
 - . un aglycone, tel qu'un groupe benzyle ou phényle, substitué ou non,
 - 30 notamment un groupe paranitrophényle, ou un groupe alkyle de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe -(CH₂)_m-CH₃ dans lequel m représente 0 ou un nombre entier de 1 à 7,
 - . une glycoprotéine, notamment une glycoprotéine substituée par des O-glycannes, telle que l'asialo-fétuine,
 - 35 . un acide aminé, un peptide, une protéine, ou une néoglycoprotéine, notamment l'albumine sérique bovine chimiquement couplée à un oligoside,

. un glycolipide, notamment le lactosylcéramide de formule $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$, le $\text{G}_{\text{M}3}$ de formule $\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$, le $\text{G}_{\text{D}3}$ de formule $\text{NeuAc}\alpha 2-8\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$,

. un lipide, un céramide,

5 . un support multivalent non immunogène, notamment un dérivé de polyacrylamide, ou une polylysine, dont les fonctions amines des chaînes latérales sont substituées par des groupes de formule $\text{Gal}\beta 1-n_o\text{X}$ - dans laquelle n_o et X sont tels que définis ci-dessus,

10 à l'exclusion du composé de formule $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$, de l'antigène P^k de formule $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$, et de l'antigène P_1 ($\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$).

15 15. Composés selon la revendication 14 de formules suivantes :

$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$,

15 $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1-\text{O-bn}$,

$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3(2-\text{O-Ac})\text{Gal}\beta 1-\text{O-Me}$,

$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-\text{O-octyl}$,

$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$,

$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$,

20 $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$,

$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$,

$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$,

$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4(\text{NeuAc}\alpha 2-3)\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$,

$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4(\text{NeuAc}\alpha 2-8\text{NeuAc}\alpha 2-3)\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$,

25 $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1-\text{O-Ser/Thr}$.

16. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un composé selon la revendication 14 ou 15, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et le cas échéant, en association avec un ou plusieurs antibiotiques.

17. Compositions alimentaires, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un composé selon la revendication 14 ou 15.

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☒ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n' étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

| 1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION | |
|--|---|
| Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes) | Revendications du brevet concernées |
| <p>HENION ET AL. : " Synthesis of alpha-gal epitopes on influenza virus vaccines, by recombinant alpha1, 3galactosyltransferase, enables the information of immune complexes with the natural anti-Gal antibody "</p> <p>VACCINE, Vol. 15, no. 11, 1997, pages 1174-1182, XP002096427 * abrégé *</p> <p>WO 96 10086 A (UNIV ROCKEFELLER) 4 avril 1996 * abrégé ; revendications 7, 24, 27 * * page 31, ligne 15 - page 32, ligne 7 *</p> | <p>1, 7, 12-16</p> <p>1, 2, 7, 9, 12-16</p> |
| 2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL | |
| <p>LOPEZ ET AL. : " Characterization of a UDP-Gal : Galbetal-3GalNAc alpha1, 4-Galactosyltransferase activity in a Mamestra brassicae cell line "</p> <p>JOURNAL OF BIOCHEMICAL CHEMISTRY, Document ne faisant pas partie de l'Etat de la Technique Vol. 273, no. 50, 11 décembre 1998, Pages 33644-33651, XP002097285</p> | |
| 3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES | |
| Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes) | Revendications du brevet concernées |
| NEANT | |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.